

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/018413

International filing date: 09 December 2004 (09.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2003-415779
Filing date: 12 December 2003 (12.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 21 April 2005 (21.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

24.12.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2003年12月12日

出 願 番 号
Application Number: 特願2003-415779

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号
The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

J P 2 0 0 3 - 4 1 5 7 7 9

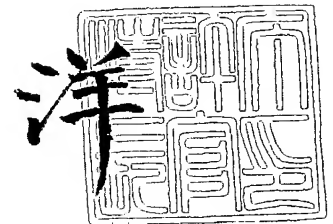
出 願 人
Applicant(s):

独立行政法人科学技術振興機構
株式会社ジーンセーシス

2005年 4月 7日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 F2-A0302
【提出日】 平成15年12月12日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 A01K 67/027
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県伊勢原市桜台2丁目16-25 エクセル伊勢原102号
 【氏名】 宮田 敏男
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都新宿区市谷柳町49市ヶ谷ヒルズ401
 【氏名】 黒川 清
【発明者】
 【住所又は居所】 石川県金沢市平和町3丁目19-15
 【氏名】 山本 博
【発明者】
 【住所又は居所】 宮城県仙台市青葉区国見ヶ丘4丁目13-9
 【氏名】 岡本 宏
【特許出願人】
 【識別番号】 503360115
 【氏名又は名称】 独立行政法人科学技術振興機構
【特許出願人】
 【識別番号】 597142376
 【氏名又は名称】 宮田 敏男
【代理人】
 【識別番号】 100102978
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 清水 初志
【選任した代理人】
 【識別番号】 100108774
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 橋本 一憲
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 041092
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1
 【包括委任状番号】 0010564

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

メグシン遺伝子、糖化最終産物受容体遺伝子および誘導型一酸化窒素合成酵素遺伝子の発現している非ヒト哺乳動物からなる、疾患モデル動物。

【請求項 2】

メグシン遺伝子、糖化最終産物受容体遺伝子および誘導型一酸化窒素合成酵素遺伝子が導入された、請求項1記載の疾患モデル動物。

【請求項 3】

次の表現型a)-f)から選択される少なくとも1つの表現型を呈する、請求項1または2記載の疾患モデル動物。

- a) 体重に対する腎重量比の上昇
- b) 尿中アルブミン値の上昇
- c) 血中トリグリセリドの上昇
- d) 低体重（発育不全）
- e) 高血糖
- f) 低インスリン血

【請求項 4】

メサングウム基質における次の所見a)からc)のうち少なくとも一つの所見を呈する、請求項1から3のいずれかに記載の疾患モデル動物。

- a) メサングウム基質の拡大
- b) 免疫グロブリンまたは／および補体蓄積の亢進
- c) コラーゲン、ラミニンまたは／およびフィブロネクチンの増加

【請求項 5】

メグシン遺伝子、糖化最終産物受容体遺伝子および誘導型一酸化窒素合成酵素遺伝子がヒト由来である、請求項1から4のいずれかに記載の疾患モデル動物。

【請求項 6】

疾患が糖尿病性腎症である、請求項1から5のいずれかに記載の疾患モデル動物。

【請求項 7】

非ヒト哺乳動物の受精卵にメグシン遺伝子、糖化最終産物受容体遺伝子および誘導型一酸化窒素合成酵素遺伝子を導入する工程を含む、メグシン遺伝子、糖化最終産物受容体遺伝子および誘導型一酸化窒素合成酵素遺伝子の発現が増強している非ヒト哺乳動物からなる疾患モデル動物の創生方法。

【請求項 8】

次の(1)、(2)の工程を含む、被験化合物の腎機能障害に対する治療効果を評価する方法。

- (1) 上記請求項1から6のいずれかに記載の疾患モデル動物に被験化合物を投与する工程、
- (2) 被験化合物を投与した疾患モデル動物の腎機能障害を緩和する作用を検出する工程

【請求項 9】

次の(1)、(2)の工程を含む、被験化合物における腎機能障害に対する治療効果を評価する方法。

- (1) 請求項1から6のいずれかに記載の疾患モデル動物に被験化合物を投与する工程
- (2) 被験化合物を投与した後、疾患モデル動物の体重に対する腎重量比、尿中アルブミン値、血中トリグリセリドの少なくともいずれかを測定する工程

【請求項 10】

次の(1)、(2)の工程を含む、被験化合物における腎機能障害に対する治療効果を評価する方法。

- (1) 請求項1から6のいずれかに記載の疾患モデル動物に被験化合物を投与する工程
- (2) 被験化合物を投与した後、疾患モデル動物のメサングウム基質の変異の有無また

はその軽減の有無を判定する工程

【請求項 11】

メサングウム基質の変異が次のa)からc)の少なくとも一つである、請求項10記載の方法

。

- a) メサングウム基質の拡大
- b) 免疫グロブリンまたは／および補体蓄積の亢進
- c) コラーゲン、ラミニンまたは／およびフィブロネクチンの増加

【請求項 12】

腎機能障害が高血糖に伴う腎機能障害である、請求項8から11のいずれかに記載の方法

。

【請求項 13】

次の(1)、(2)の工程を含む、被験化合物における高血糖に対する治療効果を評価する方法。

- (1) 請求項1から6のいずれかに記載の疾患モデル動物に被験化合物を投与する工程
- (2) 被験化合物を投与した後、疾患モデル動物のグルコース濃度または／インスリン濃度を測定する工程

【書類名】明細書

【発明の名称】Megsin/RAGE/iNOS発現疾患モデル動物及び該動物を用いた化合物の評価方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、疾患モデル動物、特に、糖尿病性腎症などの高血糖を伴う腎機能障害や糸球体障害を伴う腎機能疾患のモデル動物に関する。また、本発明は本疾患モデル動物を用いた腎機能障害に対する化合物の治療効果を評価する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、ライフスタイルや食餌の欧米化が進むにつれ、糖尿病患者は増加の一途を辿っている。糖尿病は持続的な高血糖により、全身のさまざまな組織障害、つまり合併症を引き起こす疾患である。糖尿病では冠動脈硬化症や脳血管障害などいわゆる大血管合併症以外に、網膜症、神経症、腎症、あわせて三大合併症と称される極めて糖尿病に特徴的な病態が生じる。特に腎症は、糖尿病患者にとって生命に関わる合併症であり、先進国における末期腎疾患（ESRD）の主たる原因となっている（非特許文献1）。

【0003】

インスリン依存性糖尿病（IDDM）患者の約30%が糖尿病性腎症を発症し、最終的に透析または腎移植が必要となるなどquality of life（QOL）も著しく損なわれる（非特許文献1および2）。また、糖尿病患者の平均寿命は男女とも一般人口に比べて10年以上も短い。持続性の蛋白尿、進行性腎機能低下、および組織病理学的なメサングウム細胞増殖が糖尿病性腎症の特徴的な症状である。

【0004】

従って、糖尿病合併症の発症・進展の分子メカニズムを解明し、予防・治療法を見いだすことは、医学的にも社会的にも重要な課題と考えられる。

【0005】

糖尿病性腎症の発症機序を解明し、治療及び予防方法を開発するためには、モデル動物が必要であり、当該モデル動物創生のために種々研究が進められている。しかしながら、ヒトで観察されるような糖尿病性腎症の変化を発症する動物モデルは、未だ知られておらず（非特許文献3）、穏やかなメサングウム細胞硬化のような限られた障害を発症する自然発症非肥満糖尿病（NOD）マウスなどの糖尿病モデル動物（非特許文献4）や化学的に誘発された糖尿病齧歯類モデル動物（非特許文献5）がわずかに知られているに過ぎない。さらに、これら知られているモデル動物は、いずれも再現性や病理所見の点において満足できるものではない。すなわち、軽度のメサングウム基質の増生、及びそれに伴う糸球体肥大は、従来の糖尿病性腎症モデルにおいても確認される病理所見であるが、全ての表現型（生化学的、病理学的所見）が、ヒトの糖尿病性腎症に類似しているモデル動物は知られていない。また、より病理像が進行した時に見られる結節性糸球体硬化を呈するモデルは皆無である。それゆえ、糖尿病性腎症の研究は困難となっている。こうした背景から、ヒトの糖尿病性腎症に類似した表現型を有するモデル動物の創生は、糖尿病性腎症の病態生理学を理解する上で極めて重要である。

【0006】

糖尿病性腎症は上述の通り、糖尿病の合併症の一つであり、この発症機序には次のような生体内での反応が関与していると考えられている。

【0007】

タンパク質がグルコースのような還元糖に曝されると、非酵素的糖化反応が引き起こされ、可逆性の Schiff 塩基やアマドリ転位化合物などの糖化産物が形成される（非特許文献6）。ここまでは、前期反応と呼ばれる。その後、さらに縮合、開裂、架橋形成などの複雑な分子内転位反応を経て、不可逆性の糖化最終産物（advanced glycation end-products: AGE）が生成する（非特許文献6）。このような一連の反応はグリケーションと呼ばれ、AGEとはこのような過程を経て生成される構造物の総称である。糖尿病では、長期の高

血糖状態がこの反応を加速し、そしてAGEが循環血液や種々の組織中に蓄積している（非特許文献6）。こうしたAGEの生成が糖尿病性合併症の成因の一つとして考えられる。

また、AGEを特異的リガンドとして認識する細胞表面受容体（Receptor for AGE：RAGE、以下、本書において「RAGE」と記載する）が引き起こす細胞応答によるメカニズムが注目されている。

【0008】

RAGEは、1992年ウシ肺から分離同定されたイムノグロブリンスーパーファミリーに属する分子量約35kDaの膜タンパク質であり、AGEを認識する細胞表面受容体である（非特許文献7および8）。最近になり、糖鎖修飾を受けたヒトRAGEの完全長は55kDaであることが明らかにされた（非特許文献9）。RAGEは細胞外に免疫グロブリン様ドメインを三つ持つ1回膜貫通型受容体であり、シグナル伝達に必須と考えられている短い細胞内ドメインを持つ。RAGEのAGEリガンド結合領域は三つの免疫グロブリン様ドメインのうちの最もN末端側の内部にあることが明らかにされている。また、RAGEの発現は血管内皮細胞、平滑筋細胞、周皮細胞、腎メサングウム細胞などの血管構成細胞やマクロファージなど多くの細胞種で認められている（非特許文献7および8）。このうち内皮細胞においてはAGEリガンド自身がRAGE遺伝子の発現を転写段階で誘導する事実も明らかにされている（非特許文献10）。

【0009】

以前に本発明者らは、AGE-RAGE系の糖尿病血管合併症、特に腎症、網膜症に与える影響を生体で明らかにするため、血管細胞でRAGEを過剰発現するトランスジェニックマウス（RAGE-Tg）を作製し、解析した（非特許文献11）。具体的には、血管内皮細胞特異的なマウスflk-1プロモータの下流にヒトRAGE遺伝子を連結したトランスジーンを用いてRAGE-Tgを作製し、続いて、このマウスに糖尿病を誘発するため、誘導型一酸化窒素合成酵素（iNOS：以下、本書において「iNOS」と称する）を膵β細胞特異的に過剰発現する別系統トランスジェニック（Tg）マウス（非特許文献12）と交配し、生後早期からインスリン依存型糖尿病を発症するダブルTg（RAGE/iNOS-Tg）マウスを作製した。

【0010】

このRAGE/iNOS-Tgは、腎不全およびヒト糖尿病性腎症に類似した進行性の糸球体硬化を発症した。すなわち、同腹の糖尿病発症RAGE-Tgと糖尿病発症非Tgの雄性マウスを対照に腎症の進展程度を比較検討したところ、血糖値、HbA1c値、血中AGE値などの指標は、両群間に有意差を認めないにも拘わらず、腎障害はRAGE/iNOS-Tgで有意に増悪していた。すなわち、RAGE/iNOS-Tgでは、タンパク尿の指標としての尿中アルブミン・クレアチニン比の増大、血清クレアチニン値の上昇、さらに、腎重量体重比の増大、組織学的に顕著な糸球体肥大、および糸球体硬化像が認められた。

【0011】

かくして、RAGE過剰発現が糖尿病腎症の発症・進展を促進させることがはじめて個体レベルで立証されるとともに、RAGEが腎症感受性遺伝子として位置付けられ、RAGE/iNOS-TgがESRDを介する糖尿病誘発性腎病変の過程が理解できる最初のモデル動物となりえることが確認された。従って、AGE-RAGE系は糖尿病性合併症の予防と療法のための有望な目標であると考えられる。

【0012】

このように、RAGE/iNOS-Tgは優れた糖尿病合併症のモデル動物ではあるが、より一層顕著な腎機能障害を発症し、かつその発症までの期間が短いモデル動物が得られれば、糖尿病性腎症などの糖尿病合併症の病態生理学の理解に一層役立つとともに、糖尿病合併症の治療薬などの開発に大いに役立つことになる。

【0013】

一方、本発明者らは、メサングウム細胞に特異的に発現する遺伝子であるメグシン（Megsin）を単離し（特許文献1）、メグシンを導入したトランスジェニックマウス（メグシン-Tg）を創生した。約35～40週齢のメグシン-Tgの腎糸球体組織では、メサングウム細胞を主体とする著明な細胞増殖、メサングウム基質の増生、並びに補体、免疫グロブリンが

ら成る免疫複合体の沈着が認められ、分節性の硬化 (segmental sclerosis) などのメサングウム増殖性の病理所見を示した (非特許文献 13)。これらの点から、メグシン-Tg はメサングウム増殖性糸球体腎炎のモデル動物として有用と言える。しかしながら、メグシン-Tg には尿蛋白等の所見は認められず腎機能は正常であり、さらには、メサングウム増殖性腎炎の発症まで 35~40 週齢という長期間を要するものであった。そのため、メグシン-Tg は糖尿病合併症のモデル動物としての上述した要求を満たすものではなかった。

【特許文献 1】国際公開番号 W099/15652 号公報

【非特許文献 1】Bojestig, M., et al., N. Engl. J. Med., 330:15-18 (1994)

【非特許文献 2】Krolewski, M., et al., Kidney Int., 50:2041-2046 (1996)

【非特許文献 3】Velasquez, M. T., et al., FASEB J., 4:2850-2859 (1990)

【非特許文献 4】Doi, T., et al., Lab. Invest., 63:204-212 (1990)

【非特許文献 5】Williamson, J. R., et al., Diabetes., 36:813-821 (1987)

【非特許文献 6】Brownlee, M., et al., N. Engl. J. Med., 318:1315-1321 (1988)

【非特許文献 7】Schmidt, A. M., et al., J. Biol. Chem., 267:14987-14997 (1992)

【非特許文献 8】Neeper, M., et al., J. Biol. Chem., 267:14998-15004 (1992)

【非特許文献 9】Yonekura, H., et al., Biochem. J., 370:1097-1109 (2003)

【非特許文献 10】Tanaka, N., et al., J. Biol. Chem., 275:25781-25790 (2000)

【非特許文献 11】Yamamoto, Y., et al., J. Clin. Invest., 108:261-268 (2001)

【非特許文献 12】Takamura, T., et al., J. Biol. Chem., 273:2493-2496 (1998)

【非特許文献 13】Miyata, T., et al., J. Clin. Invest., 109: 585-593 (2002)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

そこで、本発明の課題は、糖尿病性腎症のモデルとして従来のモデル動物よりも一層有用な疾患モデル動物を提供することである。また本発明は、糖尿病性腎症の治療に有用な化合物の評価方法を提供することをも課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0015】

本発明者らは、自らの研究によって、糸球体におけるメグシンの強制発現によりメサングウム増殖性糸球体腎炎を誘導できること、RAGE/iNOS-Tg は優れた糖尿病合併症のモデル動物となり得ることを明らかにしている。本発明者らはこれらの知見に基づいて、さらに腎機能障害の発症機序、とりわけ糖尿病性腎症の機序について鋭意研究を行った。その研究において、本発明につながる知見を得た。具体的には、メグシン-Tg と RAGE/iNOS-Tg とを交配させてトリプル Tg (Megsin/RAGE/iNOS-Tg) を創生した。この Megsin/RAGE/iNOS-Tg は、従来にはない著明な糖尿病性腎病変 (結節性糸球体硬化) をそれも早期に発症し、かつ糸球体肥大をはじめとする腎臓の病理像が均一に観察されることを見出した。更にこれらの症状を示す動物が、全ての表現型 (生化学的、病理学的所見) において、ヒトの糖尿病性腎症に類似していることを見出した。このようなモデル動物は、従来まったく知られていなかった。特に、より病理像が進行した時に見られる結節性糸球体硬化を呈するモデルは皆無であり、本発明のモデル動物が、糖尿病性腎症の疾患モデル動物として有用となることを見出した。本発明はこれら知見に基づくものであり、具体的には以下に示す。

〔1〕メグシン遺伝子、糖化最終産物受容体遺伝子および誘導型一酸化窒素合成酵素遺伝子の発現している非ヒト哺乳動物からなる、疾患モデル動物。

〔2〕メグシン遺伝子、糖化最終産物受容体遺伝子および誘導型一酸化窒素合成酵素遺伝子が導入された、上記〔1〕記載の疾患モデル動物。

〔3〕次の表現型 (a) - (c) から選択される少なくとも 1 つの表現型を呈する、上記〔1〕または〔2〕記載の疾患モデル動物。

(a) 体重に対する腎重量比の上昇

(b) 尿中アルブミン値の上昇

- (c) 血中トリグリセリドの上昇
- (d) 低体重 (発育不全)
- (e) 高血糖
- (f) 低インスリン血

〔4〕メサングウム基質における次の所見 (a) から (c) のうち少なくとも一つの所見を呈する、上記〔1〕から〔3〕のいずれかに記載の疾患モデル動物。

- (a) メサングウム基質の拡大
- (b) 免疫グロブリンまたは／および補体蓄積の亢進
- (c) コラーゲン、ラミニンまたは／およびフィブロネクチンの増加

〔5〕メグシン遺伝子、糖化最終産物受容体遺伝子および誘導型一酸化窒素合成酵素遺伝子がヒト由来である、上記〔1〕から〔4〕のいずれかに記載の疾患モデル動物。

〔6〕疾患が糖尿病性腎症である、上記〔1〕から〔5〕のいずれかに記載の疾患モデル動物。

〔7〕非ヒト哺乳動物の受精卵にメグシン遺伝子、糖化最終産物受容体遺伝子および誘導型一酸化窒素合成酵素遺伝子を導入する工程を含む、メグシン遺伝子、糖化最終産物受容体遺伝子および誘導型一酸化窒素合成酵素遺伝子の発現している非ヒト哺乳動物からなる疾患モデル動物の創生方法。

〔8〕次の(1)、(2)の工程を含む、被験化合物の腎機能障害に対する治療効果を評価する方法。

(1) 上記請求項1から6のいずれかに記載の疾患モデル動物に被験化合物を投与する工程、

(2) 被験化合物を投与した疾患モデル動物の腎機能障害を緩和する作用を検出する工程

〔9〕次の(1)、(2)の工程を含む、被験化合物における腎機能障害に対する治療効果を評価する方法。

(1) 上記〔1〕から〔6〕のいずれかに記載の疾患モデル動物に被験化合物を投与する工程

(2) 被験化合物を投与した後、疾患モデル動物の体重に対する腎重量比、尿中アルブミン値、血中トリグリセリドの少なくともいずれかを測定する工程

〔10〕次の(1)、(2)の工程を含む、被験化合物における腎機能障害に対する治療効果を評価する方法。

(1) 上記(1)から(6)のいずれかに記載の疾患モデル動物に被験化合物を投与する工程

(2) 被験化合物を投与した後、疾患モデル動物のメサングウム基質の変異の有無またはその軽減の有無を判定する工程

〔11〕メサングウム基質の変異が次のa)からc)の少なくとも一つである、上記〔10〕記載の方法。

- a) メサングウム基質の拡大
- b) 免疫グロブリンまたは／および補体蓄積の亢進
- c) コラーゲン、ラミニンまたは／およびフィブロネクチンの増加

〔12〕腎機能障害が高血糖に伴う腎機能障害である、上記〔8〕から〔11〕のいずれかに記載の方法。

〔13〕次の(1)、(2)の工程を含む、被験化合物における高血糖に対する治療効果を評価する方法。

(1) 上記〔1〕から〔6〕のいずれかに記載の疾患モデル動物に被験化合物を投与する工程

(2) 被験化合物を投与した後、疾患モデル動物のグルコース濃度または／インスリン濃度を測定する工程。

【発明の効果】

【0016】

本発明により、メグシン、RAGE、iNOS遺伝子の導入による疾患モデル動物が提供された。本発明のモデル動物は、著明な糸球体障害（結節性硬化病変）が認められる。このような所見は、本発明の疾患モデル動物がよりヒトの糖尿病性腎症に近い病態を呈していることを裏付けている。また、本発明のモデル動物は従来のモデルマウス（40週齢）に比し、早期（16週齢）に発症し、糸球体肥大をはじめとする各種病理像が均一である。したがって、糖尿病性腎症の原因解明に大いに役立つことが期待される。本発明のモデル動物は、糖尿病性腎症の発症メカニズムや病態の解析用途に有用であることはもちろん、糖尿病性腎症の治療薬の開発やスクリーニング、さらには薬剤の検定などにおいても有用なモデル動物となる。

【0017】

更に本発明は、高血糖症状を伴う疾患モデル動物の提供を実現した。高血糖を伴うモデル動物は知られているが、本発明の疾患モデル動物のように、短期間で確実に高血糖状態をもたらすことができる動物は知られていない。本発明の疾患モデル動物は、高血糖に起因する様々な病態の解析や治療方法の探索、高血糖の治療方法の解明に有用である。高血糖は、様々な障害を引き起こす原因となっていることが明らかにされている。したがって、高血糖によってもたらされる様々な病的変化を観察することができるモデル動物は、その病態解析において有用である。

【0018】

本発明の疾患モデル動物は、トランスジェニック動物を利用して作製することができる。トランスジェニック動物は、均一性の高いモデル動物を容易に、しかも多量に供給することから、精度の高い実験を可能とするものである。しかも、本発明の疾患モデル動物には、結節性硬化病変を認め、ヒトの病態に近い糖尿病性腎症の所見が認められた。このように実際の病態に忠実なモデル動物が提供された意義は非常に大きい。

【発明を実施するための最良の形態】

【0019】

本発明の疾患モデル動物は、非ヒト哺乳動物からなり、少なくともメグシン遺伝子、糖化最終産物受容体遺伝子（RAGE）および誘導型一酸化窒素合成酵素遺伝子（iNOS）の3つの遺伝子の発現している非ヒト哺乳動物である。これら3つの遺伝子を発現させることにより、従来のモデル動物に比べ、体重に対する腎重量比が一層上昇（メグシンTgマウスの1.5～2倍以上、正常マウスの1.5倍以上）し（顕著な腎肥大）、尿中アルブミン値が一層上昇（RAGE/iNOS-Tgマウスの2倍以上）、血中トリグリセリドの一層の上昇（メグシンTgマウスの2倍以上）などの腎障害の顕著な所見を早期に誘導することが可能となり、さらに、メサンギウム基質の拡大、免疫グロブリンまたは／および補体蓄積の亢進、コラーゲン、ラミニンまたは／およびフィブロネクチンの増加などのメサンギウム基質の変動も従来のメグシンTgマウスやRAGE/iNOS-Tgマウスに比べ早期に誘導することが可能となった。また、本発明の疾患モデル動物は正常動物に比して、低体重（発育不全）、高血糖、低インスリン血を呈する。

【0020】

本発明の疾患モデル動物は、例えば動物の各内因性遺伝子（メグシン遺伝子、RAGE遺伝子、iNOS遺伝子）のプロモータに作用し得る物質を投与等することにより得ることができるが、好ましくは、上記3つの遺伝子が導入されたトリプルトランスジェニック動物を創生することにより得られる。

【0021】

ここでメグシン遺伝子とは、上述した通り、メサンギウム細胞に特異的に発現する遺伝子であり、例えば本遺伝子を単独でマウスに導入することによりメサンギウム増殖性糸球体腎炎などの腎不全の病変を誘導し得る。メグシン遺伝子の一例として、ヒトのメグシンcDNAを配列番号1に示したが、本発明におけるメグシン遺伝子は、上述したような腎炎を誘導し得るメグシン遺伝子であれば、上記配列番号1のヒトメグシン遺伝子の類似の配列からなるもの、ヒト以外に由来するメグシン遺伝子等であってもよい。例えば、ラットメグシン、マウスメグシンは国際公開番号W099/15652号公報に記載されている。

【0022】

RAGEは、血中あるいは組織におけるグリケーションにより生成される不可逆性の糖化最終産物 (advanced glycation end-products: AGE) を特異的に認識する細胞表面受容体であり、RAGEをコードするヒトRAGE cDNAを配列番号2に示す。しかし、本発明のRAGE遺伝子は、配列番号2に示すヒトRAGE遺伝子に限定されず、AGEを認識し得る受容体蛋白質をコードする限り、配列番号2に記載の配列と異なるヒト由来の遺伝子、あるいはヒト以外に由来するRAGE遺伝子などであってもよい。

【0023】

iNOS遺伝子は誘導型一酸化窒素合成酵素をコードし、マウス cDNAはGeneBank/EMBL Data Bank M84373に登録され、本明細書にこの配列が配列番号: 3として包含される。しかし、本発明における配列番号: 3に記載の配列に限定されるものではなく、その配列とは異なるが誘導型一酸化窒素合成酵素をコードする同等の遺伝子であるマウス由来、ヒトなどを他の種に由来するiNOS遺伝子などであってもよい。

【0024】

上述した各遺伝子は、上記各塩基配列に基づいて公知の方法により得ることができる。たとえば、メグシン遺伝子であれば、メサングウム細胞のcDNAライブラリーを配列番号: 1に示した塩基配列からなるDNAをプローブとしてスクリーニングすることにより、メグシン遺伝子をコードするcDNAの単離が可能である。またこのcDNAライブラリーを鋳型として、配列番号: 1に示した塩基配列に基づいて設計したプライマーを用いてPCRを行うことによって、メグシン遺伝子を増幅して得ることができる。

【0025】

RAGE遺伝子は、血管内皮細胞、平滑筋細胞、周皮細胞、腎メサングウム細胞などの多くの細胞種で発現していることから、これらいずれかの細胞のcDNAライブラリーを配列番号: 2に示した塩基配列からなるDNAをプローブとしてスクリーニングすることにより、RAGE遺伝子をコードするcDNAの単離が可能である。またこのcDNAライブラリーを鋳型として、配列番号: 2に示した塩基配列に基づいて設計したプライマーを用いてPCRを行うことによって、RAGE遺伝子を増幅して得ることができる。

【0026】

iNOS遺伝子は、IL-1 β 刺激脾 β 細胞や活性化マクロファージ細胞などのcDNAライブラリーを配列番号: 3に記載の配列またはその一部配列からなるDNAをプローブとしてスクリーニングすることにより、iNOS遺伝子をコードするcDNAの単離が可能である。またこのcDNAライブラリーを鋳型として、配列番号: 3に記載の配列に基づいて設計したプライマーを用いてPCRを行うことによって、iNOS遺伝子を増幅して得ることができる。

【0027】

上記配列番号: 1に記載の配列とは異なるが同等の機能を保持するメグシン遺伝子、配列番号: 2に記載の配列とは異なるが同等の機能を保持するRAGE遺伝子、および配列番号: 3に記載の配列とは異なるが同等の機能を保持するiNOS遺伝子は、ストリンジェントな条件下で上記対応する配列にハイブリダイズし得るものを選択することにより得ることができる。ストリンジェントな条件とは、洗浄のための条件として、通常は「1xSSC、0.1% SDS、37℃」程度、より厳しい条件としては「0.5xSSC、0.1% SDS、42℃」程度、さらに厳しい条件として「0.1xSSC、0.1% SDS、55℃」程度を示すことができる。

【0028】

トランジェニック動物を作製するに当たって、上記各遺伝子は導入すべき動物の細胞において発現可能なプロモータに連結することが有利である。マウスやラットなど、幅広い脊椎動物で外来遺伝子の発現を誘導できるニワトリ β アクチン・プロモーターを示すことができる。また、特定の組織で遺伝子発現を実施させたい場合には、組織特異的なプロモータを用いることができる。血管内皮細胞特異的なプロモータとしてはマウスflk-1を挙げることができる。必要に応じて、外来遺伝子の発現を増強するためにエンハンサーを組み合わせてもよい。エンハンサーとプロモータを備え、更にその下流に外来遺伝子挿入用のマルチクローニングサイトを配置した既存のベクター (例えばpCAGGS等) を用いてもよ

い。このベクターは、マルチクローニングサイトの下流にウサギ β グロビン・ターミネーターが配置されており、挿入された外来遺伝子の発現効率を向上させ得る。

【0029】

上記プロモータが連結された各遺伝子を用いてトランスジェニック動物を作製する。本発明の疾患モデル動物は、上記3つの遺伝子（メグシン遺伝子、RAGE遺伝子、iNOS遺伝子）が導入されたトリプルトランスジェニック動物からなるが、これら3つの遺伝子は一つの胚芽細胞に導入して3つの遺伝子を強発現するトリプルトランスジェニック動物を作製してもよく、遺伝子毎に異なる胚芽細胞に導入し、個々のトランスジェニック動物を作製した後に順次交配して最終的に3つの外来遺伝子を備えたトリプルトランスジェニック動物を作製してもよい。本発明のトランスジェニック動物の作製方法は、特に限定はなく、公知のトランスジェニック動物の作製方法（例えば、勝木元也編、「発生工学実験マニュアル」，（日本：講談社），1989年、日本生化学会編、「新 生化学実験講座・動物実験法」（日本：東京化学同人），1991年参照）を用いることができる。以下に、一般的なトランスジェニック動物の作製プロトコルを簡単に説明する。

【0030】

トランスジェニック動物は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに、遺伝子を導入することによって作製される。遺伝子を導入する細胞としては、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階、より具体的には単細胞あるいは受精卵細胞の段階で、通常8細胞期以前のものが利用される。上記遺伝子の導入方法としては、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキストラン法等が公知である。遺伝子毎にトランスジェニック動物を作製する場合には、遺伝子毎に異なる受精卵などに遺伝子が導入される。また、3つの遺伝子群を共に導入する場合には、3つの遺伝子を含む溶液を上述したいずれかの方法で受精卵に導入する。

【0031】

ここで遺伝子を導入する細胞は、トランスジェニック動物の作製が可能なあらゆる非ヒト哺乳動物に由来する細胞であることができる。具体的には、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、イヌ、あるいはネコ等の細胞を利用することができる。たとえばラットにおいては、排卵誘発剤を投与したメスのラットに正常なオスのラットを交配させることにより、遺伝子の導入が可能な受精卵を回収することができる。ラット受精卵では、一般に雄性前核へのマイクロインジェクションにより遺伝子（または遺伝子群）が導入される。遺伝子（または遺伝子群）が導入された細胞は、体外で一晩程度の培養の後、導入に成功したと思われるものが代理母の卵管に移植され、トランスジェニックキメラ動物が誕生する。代理母には、精管を切断したオスと交配させて偽妊娠状態としたメスが利用される。

【0032】

生まれたトランスジェニックキメラ動物は、その体細胞の遺伝子を解析することによって、ゲノムに外来遺伝子（または外来遺伝子群）が組み込まれていることを確認する。F1動物の誕生のために正常な動物と交配させる。このとき、望ましくは、より多くのコピー数を持つ個体を選択するようにする。一般に遺伝子として導入した外来性のDNAは、ゲノムの同一の部分に複数コピーが直列に組み込まれる。通常はこの組み込みコピー数が多いほど、多量の遺伝子発現につながり、より明瞭な発現型が期待できる。なお、ドットブロット法によって、コピー数の相対的な比較が可能である。

【0033】

この交配の結果誕生するF1動物の中で、体細胞に外来遺伝子（または外来遺伝子群）を備えるものは、ヘテロザイゴート（heterozygote）でありながら生殖細胞に外来遺伝子（または外来遺伝子群）を伝えることができるトランスジェニック動物である。したがって、F1動物の中から体細胞に外来遺伝子（または外来遺伝子群）を保持するものを選び、これらを両親とするF2動物を誕生させることができれば、外来遺伝子（または外来遺伝子群）をホモで保持するホモザイゴート動物（homozygote animal）がF2動物として

得られる。

【0034】

上記方法で遺伝子毎に異なるトランスジェニック動物を作製した場合には、これらのうち先ず2つのトランスジェニック動物を交配させて、ダブルトランスジェニック動物を作製する。ここで得られたトランスジェニック動物に、交配させていないトランスジェニック動物を交配させることにより、トリプルトランスジェニック動物が作製される。なお、本発明の疾患モデル動物は、上記3つの遺伝子が発現している動物である限りトランスジェニック動物のいずれの世代であってもよく、3つの遺伝子DNAをヘテロで保持するF1世代、ホモで保持するF2世代以降であっても本発明に包含される。

【0035】

上記の通り作製されたトリプルトランスジェニック動物は、高血糖、腎障害（とりわけ高血糖性腎症）の病変を予想外に早期に発症する。例えば、従来のRAGE/iNOSトランスジェニックマウスと本発明のトリプルトランスジェニックマウスとで比較すると、従来は糖尿病性腎症の発症には40週齢程度を要していたのに対し、本発明では16週齢程度で発症させ得る。このようにマウスの例をとっても、本発明によって疾患の発症を早めることができ、疾患モデル動物をより迅速に提供することが可能となった。

【0036】

また、本発明のトリプルトランスジェニック動物では従来のRAGE/iNOS-Tg やメグシントgと比べて均質な腎機能障害などの表現型が得られ、質的にも一層有用なモデル動物を提供し得る。具体的には、本発明のトリプルトランスジェニック動物では腎肥大、尿中アルブミン値の上昇および血中トリグリセリドの亢進が観察される。また、メサングウム基質の増生や、結節性の糸球体硬化像を呈し、このメサングウム基質ではIV型コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチンの増大や免疫グロブリン、補体の蓄積が亢進する。こうした表現型は、糖尿病性腎症のモデルとして極めて有効となる。

【0037】

以下、本発明の腎機能障害の臨床的・病理学的特徴について説明する。
本発明の疾患モデル動物は腎肥大を呈する。腎肥大は、体重あたりの腎重量比（KW/BW）の上昇として判断される。KW/BWは、体重と腎臓の重量とをそれぞれ測定し、これらの値から算出される。正常な動物のKW/BWに比して、その値が大きい場合に腎肥大していると判断される。

【0038】

蛋白尿も本発明の疾患モデル動物の特徴である。糖尿病性腎症では、早期の腎症において、微量のアルブミン尿が検出され、その後病気の進行に伴って持続的な蛋白尿が検出されるようになる。本発明の動物でもこのような蛋白尿の特徴を呈する。蛋白尿とは、尿中の蛋白質レベルが当該動物の正常値を越えて排泄される症状を言う。尿中の蛋白質を測定する方法は公知である。たとえば、蛋白誤差法や色素結合法などの生化学的な手法は、尿蛋白質の判定的な測定方法として広く普及している。これらの測定原理に基づく尿試験紙が市販されている。また、より高感度かつ特異的な尿蛋白質の測定方法として免疫学的な原理に基づく測定方法が実用化されている。免疫学的な測定方法においては、たとえば血清アルブミンに対する抗体によって、尿中に排泄されたアルブミンが検出される。通常、尿中に排泄される蛋白質は微量である。たとえば、ラットを例にとると、正常な尿中蛋白質レベルは0～40mg/dLとされている。したがって、ラットにおいては、尿中蛋白質がこの値を超えて恒常的に排泄されるときに蛋白尿であると判定される。本発明において、尿中に排泄される蛋白質の種類は限定されない。通常、尿蛋白質は血中蛋白質の主要蛋白質であるアルブミンやグロブリンで占められる。

【0039】

本発明の動物は、血中トリグリセリドの上昇を呈する。糖尿病や腎障害の患者では、統一的に血中トリグリセリドが高値を示すことが知られており、本発明の動物でも、このような状態が発現される。血中トリグリセリドの上昇とは、当該動物の正常範囲を超えて高値を示すことをいう。血中のトリグリセリドを測定する方法は公知であり、例えば、LPL

・GK・GPDH-ジアホラーゼ・ホルマザン色素法を用いることができる。

【0040】

本発明の動物では、メサンギウム基質の拡大、結節性の糸球体硬化が生じる。糖尿病性腎症では、糸球体基底膜の肥厚、メサンギウム基質の拡大、及び糸球体の結節性硬化病変が特徴的とされており、この特徴が本発明のモデル動物でも発現される。さらに、メサンギウム基質の拡大は、その過程で生じるコラーゲン、ラミニンまたはフィブロネクチンなどの増加に基づいて観察することができる。病理組織をそれぞれの抗体を用いて免疫組織学的に解析することができる。免疫組織像を当該動物の正常な免疫組織像と比較して、染色面積・強度が多い場合に、コラーゲン、ラミニンまたはフィブロネクチンなどが増加していると判断される。一方、糸球体基底膜の肥厚は、電子顕微鏡による病理解析にて観察できる。なお、基底膜肥厚の主たる理由として、高血糖による基質代謝異常（産生亢進、代謝低下）が挙げられ、メサンギウム基質増生と同じ機序であると考えられている。

【0041】

本発明のモデル動物では、メサンギウム基質における免疫グロブリンや補体の蓄積の亢進によっても特徴付けられる。ヒト糖尿病性腎症において免疫グロブリン、補体の沈着は糸球体毛細管壁及びメサンギウム領域（メサンギウム基質のある場所）に認められ、このような病変が本発明のモデル動物でも現れる。なお、免疫グロブリンや補体はそれぞれの特異的な抗体を用いた組織免疫染色により検出することができる。そして、当該動物の正常な免疫組織染色像と比較して、染色面積・強度が大きい場合に免疫グロブリンや補体の蓄積が亢進していると判断される。

【0042】

このように、本発明のモデル動物は、糖尿病性腎症、糸球体障害（結節性硬化病変）などの腎機能障害の特徴を備えていることから、これら疾患の有効なモデル動物となる。また、本発明のモデル動物は、高血糖、低インスリン血を早期に示すことから、糖尿病のモデル動物としても有効である。従って、本発明のモデル動物は、糖尿病、その合併症である糖尿病性腎症あるいは結節性糸球体硬化などの疾患の発症機序の解明などの研究に利用できることはもちろん、高血糖や腎機能障害に対する治療・薬剤等を開発する際の評価系としても有効である。

【0043】

本発明は、上記疾患モデル動物を用いた高血糖あるいは腎機能障害に対する治療薬の評価方法をも提供する。第一の評価方法は、次の工程を含む、（１）上述した非ヒト哺乳動物からなる疾患モデル動物に被験化合物を投与する工程と、（２）被験化合物が投与された疾患モデル動物の腎機能を検査する工程とが含まれる。

【0044】

上記評価方法では、まず本発明のモデル動物に被験化合物が投与される。この投与経路は特に限定はなく、経口、静脈注射、腹腔内投与他、被験化合物に応じた方法を選択することができる。投与された疾患モデル動物と、被験化合物を投与しない対照のモデル動物との腎機能を腎機能マーカーに基づいて検査される。たとえば次のような腎機能マーカーが知られており、これらを本評価方法で使用する事ができる。腎機能マーカー：血中のクレアチニン値、血中の尿素窒素、尿中ヘモグロビン、尿中アルブミン、尿中 β 2-ミクログロブリン、尿中 α 1-酸性糖蛋白。これらの腎機能マーカーを測定するための方法も公知である。

【0045】

したがって、被験化合物を投与する前後で、これらの指標の観察結果を比較することにより、被験化合物の治療薬としての有効性を評価することができる。あるいは、同系のトランスジェニック動物を用いれば、動物の間でこれらの指標の観察結果を比較することによって、被験化合物間の有効性を比較することもできる。

【0046】

第二の評価方法では、糖尿病性腎症などの糸球体障害に関連した臨床学的なマーカーを指標に評価する方法であり、上述した疾患モデル動物に被験化合物を投与する工程と、被

験化合物を投与した後に疾患モデル動物の体重に対する腎重量比、蛋白尿値、血中トリグリセリドの少なくともいずれかを測定する工程が含まれる。すなわち、本方法では腎機能障害に対する治療効果を腎重量比の増大、蛋白尿、血中トリグリセリドの一つ以上の指標に基づいて評価される。

【0047】

本発明の評価方法では、まず本発明のモデル動物に被験化合物が投与される。この投与経路もまた、上述のように特に限定はない。投与された疾患モデル動物と、被験化合物を投与しない対照のモデル動物との腎機能を上記指標に基づいて比較する。また、さらに対象として健常な動物と比較してもよい。腎重量比の増大、蛋白尿、血中トリグリセリドの測定方法は上述した通りである。被験化合物投与群において、非投与群と比べ、腎障害の程度が緩和、あるいは正常な動物の値まで回復させ得る化合物は、糖尿病性腎症などの糸球体障害を伴う腎機能障害の治療薬になり得る。

【0048】

第三の評価方法は本発明の疾患モデル動物に被験化合物を投与する工程、被験化合物を投与した後、疾患モデル動物のメサングウム基質の変異の有無またはその軽減の有無を判定する工程が含まれる。この評価方法では、腎機能障害に対する緩和作用を組織学的な検査方法により評価される。特に糖尿病性腎症などの糸球体障害を伴う腎機能障害ではメサングウム基質の拡大、免疫グロブリンまたは／および補体蓄積の亢進、コラーゲン、ラミニンまたは／およびフィブロネクチンの増加がみられることから、これらのうちいずれかが緩和または回復されたかに基づいて評価される。

【0049】

具体的には、本発明のモデル動物に被験化合物が投与される。投与された疾患モデル動物と、被験化合物を投与しない対照のモデル動物とのメサングウム基質を組織学的に比較する。例えば、メサングウム基質の拡大の緩和の有無は、PAS染色によりメサングウム基質を染色し、その面積が測定される。そして、被験化合物投与群が、非投与群に比べて、メサングウム基質の面積が小さく、または正常な動物と同等まで回復している場合、当該被験化合物は糖尿病性腎症などの糸球体障害を伴う腎機能障害に対する治療効果を有すると評価される。同様に、メサングウム基質を免疫グロブリンまたは補体に対する特異抗体を用いて免疫染色し、免疫グロブリンまたは補体の蓄積量を測定する。この測定値が、被験化合物非投与群に比べて被験化合物投与群で小さくなった場合に、当該被験化合物は糸球体障害を伴う腎機能障害に対する治療効果を有すると評価される。また、コラーゲン、ラミニンまたは／およびフィブロネクチンに対する特異抗体を用いて免疫染色し、これらの存在量を測定する。そして、この値が被験化合物非投与群に比べて被験化合物投与群で小さくなった場合に、当該被験化合物は糸球体障害を伴う腎機能障害に対する治療効果を有すると評価される。

【0050】

本発明は、糖尿病に対する治療効果を評価するための方法も提供する。本方法には、(1) 上記疾患モデル動物に被験化合物を投与する工程と、(2) 被験化合物を投与した後、疾患モデル動物のグルコース濃度または／およびインスリン濃度を測定する工程が含まれる。

【0051】

本発明の評価方法において、糖尿病の治療効果の程度は、糖尿病マーカー、例えば、グルコース濃度、インスリン濃度を指標として評価することができる。グルコース濃度を測定する対象は血液、尿、汗などのいずれの体液を対象としてもよい。インスリン濃度を測定する対象は、血液を用いることが好ましい。また、糖尿病症状に対する治療効果を知るための指標としては、ヘモグロビンHc1、糖化アルブミン、フルクトサミン、尿ケトン体などを用いることもできる。これらの診断指標の経時的変化を観察することによって、糖尿病に対する治療効果を評価することができる。したがって、被験化合物を投与する前後で、これらの指標の観察結果を比較することにより、被験化合物の治療薬としての有効性を評価することができる。あるいは、同系のトランスジェニック動物を用いれば、動物

の間でこれらの指標の観察結果を比較することによって、被験化合物間の有効性を比較することもできる。

【0052】

以下、本発明を実施例に基づいて説明するが、本発明は、これら実施例に限定されるものではない。

【実施例1】

【0053】

Megsin/RAGE/iNOS-Tgの作製

RAGE/iNOS-Tgマウス (Yamamoto, Y., et al., J. Clin. Invest., 108:261-268 (2001)) と Megsin-Tgマウス (Miyata, T., et al., J. Clin. Invest., 109: 585-593 (2002)) とを交配し、Megsin/RAGE/iNOS-Tgマウスを得た。尾組織からゲノムDNAを抽出し、文献 (Yamamoto, Y., et al., J. Clin. Invest., 108:261-268 (2001)、Miyata, T., et al., J. Clin. Invest., 109: 585-593 (2002)) 記載の方法によりPCR法を用いてRAGE、iNOS およびMegsinの発現を確認した。具体的には、生後4週齢以降にTgマウスの尾の一部を切断し、DNA抽出キット (Qiagen tissue kit; Qiagen社) を用いてゲノムDNAを抽出した。これを鋳型にして、導入遺伝子断片のPCRによる増幅を行い各導入遺伝子の存在を確認を行った。Megsin遺伝子のPCR検出には、 β -gl-3プライマー (5'-CTT CTG GCG TGT GAC C GG CG-3' / 配列番号: 4) と hM2-2プライマー (5'-ATC GAA TTC TGA GAT CAT AAT CCC TGT GGG ATG C-3' / 配列番号: 5) のプライマーを用い、これらプライマーによりPCR増幅産物 (400bp) が得られる個体を選別した (図1)。また、RAGE遺伝子の検出では flk-1 プロモータ (5'-AGG GAC GGA GAA GGA GT-3' / 配列番号: 6) (Ronick, V. et al., Circ. Res., 79:277-285 (1996)) 及びヒトRAGE遺伝子 (5'-TCACCCACAGACTGAG-3' / 配列番号: 7) (Sugaya, K. et al., Genomics, 23:408-419 (1994)) プライマーを用い、354bpの増幅産物を確認した (図1)。iNOS遺伝子の検出では、F-primer (5'-GTGGGCTATGGGTTTGTGG AAGGAGA-3' / 配列番号: 8) 及び R-primer (5'-CGATGTCACATGCAGCTTGT-3' / 配列番号: 9) を用い、800bpの増幅産物を確認した (図1)。得られたMegsin/RAGE/iNOS-Tgマウスを非トランスジェニックであるCD-1 (日本チャールズ・リバー) と戻し交配を行い、遺伝背景をCD-1とした。

【実施例2】

【0054】

Megsin/RAGE/iNOS-Tgの病理所見

16週齢の各Megsin/RAGE/iNOS-Tgマウスから腎臓を摘出し、常法および文献記載の方法 (WO01/24628) により腎糸球体のPAS染色およびPAM染色を行った。PAM染色は、カルノア固定パラフィン包埋組織を、4ミクロンに薄切したものを用いた。PAS染色 (Periodic Acid Schiff reaction) は、一般的に多糖類を赤色に染色する。腎病理では、メサングウム基質や基底膜の構成成分である糖タンパクを赤色で染色し、メサングウム基質の増生や、基底膜の肥厚を観察することができる。一方、PAM染色 (Periodic Acid-Methenamine Silver stain) は、一般的に基底膜や結合組織成分を黒色に染色する (鍍銀染色)。腎病理では、メサングウム基質の硬化 (線維化) や基底膜の肥厚を黒色に染色する。

【0055】

PAS染色、PAM染色の結果を図2に示す。PAS染色の結果では、Megsin/RAGE/iNOS-Tgマウス (9匹) の高血糖群 (6匹、血糖値500mg/dl以上) の全例において強度の糸球体障害 (結節性硬化病変) が確認された。野生型の個体では異常は認められなかった。すなわち、メサングウム基質の著明な増加が全体的かつ散在的にみられ、糸球体肥大が認められた。一方、糸球体細胞数はむしろ減少しており、既に糸球体細胞死を伴う硬化糸球体像を呈していることが判った。またPAM染色において、拡大したメサングウム基質の硬化も確認された。

【0056】

対照としたRAGE/iNOS-Tgマウス (11匹、高血糖 (400mg/dl以上) 群は10匹) では、全体的あるいは分節性のメサングウム基質増加を呈する糸球体が局在的に認められた。糸球体

細胞数は保たれていた。尿細管間質の変化は、まれに認める程度であった。PAM染色にて確認される硬化も、RAGE/iNOS/megsin-Tgマウスに比し軽度であった。また、Megsin-Tgマウスは、16週齢では、特に病理学的所見は認められなかった(図2)。

【実施例3】

【0057】

Megsin/RAGE/iNOS-Tgの腎重量、尿・血液生化学検査

16週齢のMegsin/RAGE/iNOS-Tgマウスの腎重量、尿・血液生化学値を測定した(表1)。比較対照として、他のTgマウス(iNOS-Tg、RAGE/iNOS-Tg Megsin/iNOS-Tg Megsin/RAGE-Tg Megsin-Tg、RAGE-Tg)および野生型マウス(CD-1)を用いた。測定項目は次の通り。体重(BW)、腎重量(KW)。血清:総蛋白(TP:Biuret法)、トリグリセリド(TG:LPL・GK・GPDH-ジアホラーゼホルマザン色素法)、総コレステロール(Tcho:酵素法)、尿素窒素(BUN:ウレアーゼUV法)、クレアチニン(Cr:アルカリピクリン酸法)、インスリン(Insulin:ELISA法)、血中グルコース濃度(GLU:GOD・POD法)、GOT、GPT。尿:アルブミン(HbA1c:ラテックス凝集阻止法)、総蛋白(TP:ピロガロールレッド法)、尿素窒素(BUN:ウレアーゼUV法)、クレアチニン(Cr:アルカリピクリン酸法)。なお、TP、CRE、GLUはいずれも尿(1回採尿、スポット尿)を試料に測定した結果を示す。

【0058】

表1に示す通り、Megsin/RAGE/iNOS-Tgマウスは、RAGE/iNOS-TgマウスやMegsin-Tgに比し、KW/BWが高く腎肥大が認められ、また、アルブミン尿、血中トリグリセリドの亢進が認められた。また、Megsin/RAGE/iNOS-Tgマウスは、非トランスジェニックマウスに比し、低体重、高血糖、低インスリンを呈した。

【0059】

【表 1】

Triple Ig 生化学データ

information : 16wks of age, CD-1 (F4)

mouse line	HbA1c (%)	BW (g)	KW (g)	KW/BW	GLU (mg/dl)	Insulin (ng/ml)	BUN (mg/dl)	CRE (mg/dl)
NOS (n=5)	7.2±1.3	43.5±3.3	1.08±0.15 *3	0.025±0.003 *1	858.0±200.8 *1	0.34±0.16 *2	41.8±12.7	0.78±0.11
CD-1 (n=6)	43.1±8.8	43.1±8.8	0.72±0.14	0.017±0.003	194.7±56.8	4.40±3.80	30.7±5.0	0.62±0.13
meg/NOS/RAGE (n=8)	6.5±1.6	33.1±6.5 *1	0.98±0.32	0.030±0.009 *1	682.6±373.8 *1	0.43±0.37 *2	40.6±16.6	0.76±0.21
RAGE/NOS (n=10)	7.6±1.3	45.3±3.4	1.11±0.19 *3	0.024±0.004 *1	766.4±167.8 *1	0.27±0.20 *2	38.6±7.3 *2	0.75±0.15
meg/NOS (n=5)	5.9±2.7	35.6±5.7 *3	0.86±0.31	0.022±0.006	699.6±390.9 *1	0.52±0.52	41.2±19.3	0.68±0.22
meg/RAGE (n=10)	40.2±10.2	40.2±10.2	0.65±0.14	0.016±0.004	191.6±87.6	2.64±2.32	35.7±8.0	0.62±0.11
meg (n=11)	44.2±11.4	44.2±11.4	0.69±0.17	0.015±0.002	225.9±64.8	3.99±3.82	34.3±5.5	0.60±0.07
RAGE (n=11)	48.5±7.3	48.5±7.3	0.71±0.17	0.014±0.004	180.8±35.1	3.99±3.82	33.4±6.6	0.56±0.11

mouse line	TP (g/dl)	TCHO (mg/dl)	TG (mg/dl)	GOT (U/l)	GPT (U/l)	ALB/CRE ratio
NOS (n=5)	3.8±0.3	146.2±17.2	318.6±303.5	90.2±37.2	40.2±11.1	0.02±0.01
CD-1 (n=6)	4.4±0.3	148.8±54.0	169.0±88.2	137.0±33.7	49.7±25.5	0.14±0.07
meg/NOS/RAGE (n=8)	4.2±1.6	145.5±29.3	436.3±296.1	149.3±34.0	41.1±11.6	0.06±0.02
RAGE/NOS (n=10)	4.7±2.2	148.2±18.1	388.3±258.3	109.3±47.9 *2	48.7±22.9	0.15±0.06
meg/NOS (n=5)	4.0±0.5	151.6±31.8	500.6±402.5	105.4±32.5	38.8±15.2	0.09±0.04
meg/RAGE (n=10)	4.7±0.9	132.0±39.7	224.5±122.6	145.0±42.3	53.1±30.7	-
meg (n=11)	4.9±1.7	161.4±35.6	221.1±72.5	140.0±79.0	48.2±18.5	0.11±0.02
RAGE (n=11)	4.3±0.3	137.5±31.7	190.5±105.2	160.9±100.4	50.2±25.2	0.11±0.02

*1: $P < 0.001$, vs CD-1*2: $P < 0.05$, vs CD-1*3: $P < 0.01$, vs CD-1

non : NS

注 1) DRI CEHM 3500V (富士フイルムメディカル製) にて測定

注 2) insulin データは、溶血検体多く、参考値とする。

注 3) meg 群の「ALB/CRE ratio」は検体量不足のため測定不可

【実施例 4】

【0060】

蛍光抗体法による免疫複合体の沈着

蛍光抗体法を用い、免疫複合体の沈着を調べた。Megsin/RAGE/iNOS-Tgマウスから腎臓組織を採取した。腎臓組織は、凍結組織包埋剤 (O. C. T. compound, Tissue Tek Miles 社、Elkhart, IN) に包埋し、ドライアイス/アセトンで瞬時に凍結した。この凍結包埋組織から4 μ mの凍結切片を作製した。この凍結切片を4%のスキムミルクにより室温で60分間ブロッキングした後、1:200に希釈したフルオレッセインイソチオシアネート (FITC) 標識ヤギ抗マウスIgG、IgA、IgM、またはC3抗体 (Cappel Research Products社) のいずれかと4℃で一晩インキュベートした。反応後、PBSで洗浄し、グリセリンPBSで封入し、蛍光顕微鏡で鏡検した。

【0061】

その結果、Megsin/RAGE/iNOS-Tgマウスは、RAGE/iNOS-Tgマウスに比し、免疫グロブリン、補体のメサンギウム基質での蓄積が亢進していることが判った (図3、および図4)。

【実施例 5】

【0062】

メサンギウム基質の変動

16週齢の各Tgマウスにつき、免疫組織染色によりメサンギウム基質の変動を検討した。メサンギウム基質の成分を同定するために、以下の抗体を用いて、凍結切片に免疫組織染色法 (Nangaku, M. et.al., J. Am. Soc. Nephrol. 10, 2323-2331, 1999) を施行した。IV型コラーゲンは、ヤギ抗IV型コラーゲン・ポリクローナル抗体 (Southern Biotechnology社) で同定した。フィブロネクチンはウサギ抗フィブロネクチン抗体 (Chemicon社) で確認した。ラミニンはウサギ抗ラミニン抗体 (Chemicon社) を用いて確認した。

【0063】

コントロールのRAGE/iNOS-TgマウスやMegsin-Tgマウスに比べ、Megsin/RAGE/iNOS-Tgマウスにおける拡大したメサンギウム基質にIV型コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチンの増加が認められた (図5、図6、および図7)。同様の現象はヒトの糖尿病性腎症においても認められることが知られている。

【0064】

本発明のトランスジェニック動物では、メグシン高発現で拡大する基質の処理が加速的に低下したため、糸球体障害が悪化し硬化に至るまでの時間が早まることが考えられる。また、トリプルトランスジェニック (Megsin/RAGE/iNOS-Tg) 動物の糸球体は、メグシンの高発現と高血糖といった負荷に曝されたメサンギウム細胞と、酸化ストレス下の内皮細胞とによって構成されると推測される。メグシン高発現と高血糖負荷に曝されたメサンギウム細胞だけでは糸球体障害は軽度である (Megsin/iNOS-Tg)。しかし、内皮細胞にも負荷 (AGE-RAGE経路活性化、すなわち強い酸化ストレスと内皮細胞からの各種サイトカイン産生) が罹ると、病像は重篤化する。その裏付けとして、正常血糖値を示すMegsin/RAGE/iNOS-Tgマウス (内皮細胞でAGE-RAGE経路活性化負荷がかかっていないTgマウス) の病像も軽度である。Megsin/RAGE/iNOS-Tgマウスは、メサンギウム細胞/内皮細胞のクロストークが病態形成に及ぼす影響を示唆している。

【実施例 6】

【0065】

Megsin/RAGE/iNOS-Tgマウスの病理解析

Megsin/RAGE/iNOS-Tgマウスの腎臓組織に対し電子顕微鏡による病理解析を行った。16週のMegsin/RAGE/iNOS-Tgマウスの腎臓組織を2%グルタルアルデヒドを含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液中に2時間浸して固定し、さらに2%四酸化オスミウムで後固定した。固定した腎臓組織をエタノールで脱水し、最終的にEpon 812 (TAAB社、イギリス) 中に包埋した。この試料から切り出した超薄切片を酢酸ウランで染色し、アセトンで処理した後、透過電子顕微鏡 (倍率20,000倍) (JEM-1200EX, 日本電子、日本) により解析した。

【0066】

解析結果を図8に示す。Megsin/RAGE/iNOS-Tgマウスでは、糸球体上皮細胞において足突起の消失及び高密度沈着物の検出が認められ、糸球体内皮細胞では窓の消失が認められた(図8A)。また、糸球体基底膜の不整・層状化(図8B)、メサンギウム基質の増生、及び結節(図8C)、さらには糸球体上皮細胞の空胞形成(図8D)が確認された。これらの所見は、Megsin/RAGE/iNOS-Tgマウスの糸球体構成細胞(上皮、内皮、およびメサンギウム細胞)や基底膜に形態異常が生じたことを示すものである。

【産業上の利用可能性】

【0067】

本発明のモデル動物は、高血糖に伴い重篤な腎機能障害(アルブミン尿)、及び糸球体病変(メサンギウム基質の増生、基底膜肥厚、結節性硬化病変)を呈し、特筆すべきことは、ヒトの糖尿病性腎症に極めて類似の病像を呈することである。従来の糖尿病性腎症モデル動物は病理所見に乏しいのに対し、本モデル動物は早期より進行性慢性病変を呈し、その発症率も高いことから、糖尿病性腎症の発症・進展の機序解明、創薬において有益となる。またさらに、上記糸球体障害を伴う腎機能障害を治療するための医薬品の開発に本モデル動物を有益となる。本願は、疾患モデル動物だけでなく、このモデル動物を用いた腎機能障害を治療薬の評価系をも提供している。そのため、本発明は、腎機能障害を伴う疾患の臨床的な研究、医薬品開発に大いに役立つ。さらには、本発明の疾患モデル動物は、高血糖を呈することから糖尿病の臨床学的な研究や治療・予防薬の開発にも大いに役立つことが期待される。

【図面の簡単な説明】

【0068】

【図1】トリプルトランスジェニックマウスにおいて、導入された3つの遺伝子(RAGE遺伝子、メグシン遺伝子、iNOS遺伝子)の存在をPCRにより確認した結果を示す。

【図2】実施例のメグシン/RAGE/iNOS-Tgマウスおよび対照マウスの腎糸球体組織をPASまたはPAM染色した結果を示す顕微鏡写真である。上段はメグシン/RAGE/iNOS-Tgマウス、中段: RAGE/iNOS-Tgマウス、下段: メグシン-Tgマウス。いずれ16週齢マウスの腎臓組織を採取した。

【図3】蛍光抗体法を用いて、メサンギウム基質における免疫グロブリンの蓄積を検出した結果を示す蛍光顕微鏡写真である。左: 対照RAGE/iNOS-Tgマウス由来、右: 本実施例のメグシン/RAGE/iNOS-Tgマウス由来。

【図4】蛍光抗体法を用いて、メサンギウム基質における補体の蓄積を検出した結果を示す蛍光顕微鏡写真である。左: 対照RAGE/iNOS-Tgマウス由来、右: 本実施例のメグシン/RAGE/iNOS-Tgマウス由来。

【図5】抗IV型コラーゲン抗体を用いた免疫組織染色法によりメサンギウム基質に存在するIV型コラーゲンを染色した結果を示す顕微鏡写真である。左: 本実施例のメグシン/RAGE/iNOS-Tgマウス由来、右: 対照メグシン-Tgマウス由来。

【図6】抗フィブロネクチン抗体を用いた免疫組織染色法によりメサンギウム基質に存在するフィブロネクチンを染色した結果を示す顕微鏡写真である。左: 本実施例のメグシン/RAGE/iNOS-Tgマウス由来、右: 対照メグシン-Tgマウス由来。

【図7】抗ラミニン抗体を用いた免疫組織染色法によりメサンギウム基質に存在するラミニンを染色した結果を示す顕微鏡写真である。左: 本実施例のメグシン/RAGE/iNOS-Tgマウス由来、右: 対照メグシン-Tgマウス由来。

【図8】Megsin/RAGE/iNOS-Tgマウスの腎組織の病理解析結果を示す電子顕微鏡写真である。左に対照として正常マウス(非トランスジェニックマウス)由来の腎組織を比較として示す。

SEQUENCE LISTING

agc att gtg aat ggg ctt ttt gct gaa aaa gtg tat ggc ttt cat aag	336
Ser Ile Val Asn Gly Leu Phe Ala Glu Lys Val Tyr Gly Phe His Lys	
100 105 110	
gac tac att gag tgt gcc gaa aaa tta tac gat gcc aaa gtg gag cga	384
Asp Tyr Ile Glu Cys Ala Glu Lys Leu Tyr Asp Ala Lys Val Glu Arg	
115 120 125	
gtt gac ttt acg aat cat tta gaa gac act aga cgt aat att aat aag	432
Val Asp Phe Thr Asn His Leu Glu Asp Thr Arg Arg Asn Ile Asn Lys	
130 135 140	
tgg gtt gaa aat gaa aca cat ggc aaa atc aag aac gtg att ggt gaa	480
Trp Val Glu Asn Glu Thr His Gly Lys Ile Lys Asn Val Ile Gly Glu	
145 150 155 160	
ggt ggc ata agc tca tct gct gta atg gtg ctg gtg aat gct gtg tac	528
Gly Gly Ile Ser Ser Ser Ala Val Met Val Leu Val Asn Ala Val Tyr	
165 170 175	
ttc aaa ggc aag tgg caa tca gcc ttc acc aag agc gaa acc ata aat	576
Phe Lys Gly Lys Trp Gln Ser Ala Phe Thr Lys Ser Glu Thr Ile Asn	
180 185 190	
tgc cat ttc aaa tct ccc aag tgc tct ggg aag gca gtc gcc atg atg	624
Cys His Phe Lys Ser Pro Lys Cys Ser Gly Lys Ala Val Ala Met Met	
195 200 205	
cat cag gaa cgg aag ttc aat ttg tct gtt att gag gac cca tca atg	672
His Gln Glu Arg Lys Phe Asn Leu Ser Val Ile Glu Asp Pro Ser Met	
210 215 220	
aag att ctt gag ctc aga tac aat ggt ggc ata aac atg tac gtt ctg	720
Lys Ile Leu Glu Leu Arg Tyr Asn Gly Gly Ile Asn Met Tyr Val Leu	
225 230 235 240	
ctg cct gag aat gac ctc tct gaa att gaa aac aaa ctg acc ttt cag	768
Leu Pro Glu Asn Asp Leu Ser Glu Ile Glu Asn Lys Leu Thr Phe Gln	
245 250 255	
aat cta atg gaa tgg acc aat cca agg cga atg acc tct aag tat gtt	816
Asn Leu Met Glu Trp Thr Asn Pro Arg Arg Met Thr Ser Lys Tyr Val	
260 265 270	
gag gta ttt ttt cct cag ttc aag ata gag aag aat tat gaa atg aaa	864
Glu Val Phe Phe Pro Gln Phe Lys Ile Glu Lys Asn Tyr Glu Met Lys	
275 280 285	
caa tat ttg aga gcc cta ggg ctg aaa gat atc ttt gat gaa tcc aaa	912
Gln Tyr Leu Arg Ala Leu Gly Leu Lys Asp Ile Phe Asp Glu Ser Lys	

290	295	300	
gca gat ctc tct ggg att gct tcg ggg ggt cgt ctg tat ata tca agg			960
Ala Asp Leu Ser Gly Ile Ala Ser Gly Gly Arg Leu Tyr Ile Ser Arg			
305	310	315	320
atg atg cac aaa tct tac ata gag gtc act gag gag ggc acc gag gct			1008
Met Met His Lys Ser Tyr Ile Glu Val Thr Glu Glu Gly Thr Glu Ala			
	325	330	335
act gct gcc aca gga agt aat att gta gaa aag caa ctc cct cag tcc			1056
Thr Ala Ala Thr Gly Ser Asn Ile Val Glu Lys Gln Leu Pro Gln Ser			
	340	345	350
acg ctg ttt aga gct gac cac cca ttc cta ttt gtt atc agg aag gat			1104
Thr Leu Phe Arg Ala Asp His Pro Phe Leu Phe Val Ile Arg Lys Asp			
	355	360	365
gac atc atc tta ttc agt ggc aaa gtt tct tgc cct tga			1143
Asp Ile Ile Leu Phe Ser Gly Lys Val Ser Cys Pro			
370	375	380	
<210> 2			
<211> 1391			
<212> DNA			
<213> Homo sapiens			
<220>			
<221> CDS			
<222> (1)..(1215)			
<223>			
<400> 2			
ggg gca gcc gga aca gca gtt gga gcc tgg gtg ctg gtc ctc agt ctg			48
Gly Ala Ala Gly Thr Ala Val Gly Ala Trp Val Leu Val Leu Ser Leu			
1	5	10	15
tgg ggg gca gta gta ggt gct caa aac atc aca gcc cgg att ggc gag			96
Trp Gly Ala Val Val Gly Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu			
	20	25	30
cca ctg gtg ctg aag tgt aag ggg gcc ccc aag aaa cca ccc cag cgg			144
Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg			
	35	40	45
ctg gaa tgg aaa ctg aac aca ggc cgg aca gaa gct tgg aag gtc ctg			192
Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu			
50	55	60	

tct ccc cag gga gga ggc ccc tgg gac agt gtg gct cgt gtc ctt ccc Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro 65 70 75 80	240
aac ggc tcc ctc ttc ctt ccg gct gtc ggg atc cag gat gag ggg att Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile 85 90 95	288
ttc cgg tgc agg gca atg aac agg aat gga aag gag acc aag tcc aac Phe Arg Cys Arg Ala Met Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn 100 105 110	336
tac cga gtc cgt gtc tac cag att cct ggg aag cca gaa att gta gat Tyr Arg Val Arg Val Tyr Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp 115 120 125	384
tct gcc tct gaa ctc acg gct ggt gtt ccc aat aag gtg ggg aca tgt Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys 130 135 140	432
gtg tca gag gga agc tac cct gca ggg act ctt agc tgg cac ttg gat Val Ser Glu Gly Ser Tyr Pro Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp 145 150 155 160	480
ggg aag ccc ctg gtg cct aat gag aag gga gta tct gtg aag gaa cag Gly Lys Pro Leu Val Pro Asn Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln 165 170 175	528
acc agg aga cac cct gag aca ggg ctc ttc aca ctg cag tcg gag cta Thr Arg Arg His Pro Glu Thr Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu 180 185 190	576
atg gtg acc cca gcc cgg gga gga gat ccc cgt ccc acc ttc tcc tgt Met Val Thr Pro Ala Arg Gly Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys 195 200 205	624
agc ttc agc cca ggc ctt ccc cga cac cgg gcc ttg cgc aca gcc ccc Ser Phe Ser Pro Gly Leu Pro Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro 210 215 220	672
atc cag ccc cgt gtc tgg gag cct gtg cct ctg gag gag gtc caa ttg Ile Gln Pro Arg Val Trp Glu Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu 225 230 235 240	720
gtg gtg gag cca gaa ggt gga gca gta gct cct ggt gga acc gta acc Val Val Glu Pro Glu Gly Gly Ala Val Ala Pro Gly Gly Thr Val Thr 245 250 255	768
ctg acc tgt gaa gtc cct gcc cag ccc tct cct caa atc cac tgg atg Leu Thr Cys Glu Val Pro Ala Gln Pro Ser Pro Gln Ile His Trp Met	816

260	265	270	
aag gat ggt gtg ccc ttg ccc ctt ccc ccc agc cct gtg ctg atc ctc			864
Lys Asp Gly Val Pro Leu Pro Leu Pro Pro Ser Pro Val Leu Ile Leu			
275	280	285	
cct gag ata ggg cct cag gac cag gga acc tac agc tgt gtg gcc acc			912
Pro Glu Ile Gly Pro Gln Asp Gln Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Thr			
290	295	300	
cat tcc agc cac ggg ccc cag gaa agc cgt gct gtc agc atc agc atc			960
His Ser Ser His Gly Pro Gln Glu Ser Arg Ala Val Ser Ile Ser Ile			
305	310	315	320
atc gaa cca ggc gag gag ggg cca act gca ggc tct gtg gga gga tca			1008
Ile Glu Pro Gly Glu Glu Gly Pro Thr Ala Gly Ser Val Gly Gly Ser			
325	330	335	
ggg ctg gga act cta gcc ctg gcc ctg ggg atc ctg gga ggc ctg ggg			1056
Gly Leu Gly Thr Leu Ala Leu Ala Leu Gly Ile Leu Gly Gly Leu Gly			
340	345	350	
aca gcc gcc ctg ctc att ggg gtc atc ttg tgg caa agg cgg caa cgc			1104
Thr Ala Ala Leu Leu Ile Gly Val Ile Leu Trp Gln Arg Arg Gln Arg			
355	360	365	
cga gga gag gag agg aag gcc cca gaa aac cag gag gaa gag gag gag			1152
Arg Gly Glu Glu Arg Lys Ala Pro Glu Asn Gln Glu Glu Glu Glu Glu			
370	375	380	
cgt gca gaa ctg aat cag tcg gag gaa cct gag gca ggc gag agt agt			1200
Arg Ala Glu Leu Asn Gln Ser Glu Glu Pro Glu Ala Gly Glu Ser Ser			
385	390	395	400
act gga ggg cct tga gggggccaca gacagatccc atccatcagc tcccttttct			1255
Thr Gly Gly Pro			
ttttcccttg aactgtttctg gcctcagacc aactctctcc tgtataatct ctctcctgta			1315
taacccacc ttgccaaagt tttttctaca accagagccc cccacaatga tgattaaaca			1375
cctgacacat cttgca			1391

<210> 3
 <211> 3991
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (185)..(3619)

<223>

<400> 3

aggccccacg ggacacagtg tcactggttt gaaacttctc agccaccttg gtgaagggac 60

tgagctgtta gagacacttc tgaggctcct cacgcttggg tcttgttcac tccacggagt 120

agcctagtca actgcaagag aacggagaac gttggatttg gagcagaagt gcaaagtctc 180

agac atg gct tgc ccc tgg aag ttt ctc ttc aaa gtc aaa tcc tac caa 229
 Met Ala Cys Pro Trp Lys Phe Leu Phe Lys Val Lys Ser Tyr Gln
 1 5 10 15

agt gac ctg aaa gag gaa aag gac att aac aac aac gtg aag aaa acc 277
 Ser Asp Leu Lys Glu Glu Lys Asp Ile Asn Asn Asn Val Lys Lys Thr
 20 25 30

cct tgt gct gtt ctc agc cca aca ata caa gat gac cct aag agt cac 325
 Pro Cys Ala Val Leu Ser Pro Thr Ile Gln Asp Asp Pro Lys Ser His
 35 40 45

caa aat ggc tcc ccg cag ctc ctc act ggg aca gca cag aat gtt cca 373
 Gln Asn Gly Ser Pro Gln Leu Leu Thr Gly Thr Ala Gln Asn Val Pro
 50 55 60

gaa tcc ctg gac aag ctg cat gtg aca tcg acc cgt cca cag tat gtg 421
 Glu Ser Leu Asp Lys Leu His Val Thr Ser Thr Arg Pro Gln Tyr Val
 65 70 75

agg atc aaa aac tgg ggc agt gga gag att ttg cat gac act ctt cac 469
 Arg Ile Lys Asn Trp Gly Ser Gly Glu Ile Leu His Asp Thr Leu His
 80 85 90 95

cac aag gcc aca tcg gat ttc act tgc aag tcc aag tct tgc ttg ggg 517
 His Lys Ala Thr Ser Asp Phe Thr Cys Lys Ser Lys Ser Cys Leu Gly
 100 105 110

tcc atc atg aac ccc aag agt ttg acc aga gga ccc aga gac aag cct 565
 Ser Ile Met Asn Pro Lys Ser Leu Thr Arg Gly Pro Arg Asp Lys Pro
 115 120 125

acc cct ctg gag gag ctc ctg cct cat gcc att gag ttc atc aac cag 613
 Thr Pro Leu Glu Glu Leu Leu Pro His Ala Ile Glu Phe Ile Asn Gln
 130 135 140

tat tat ggc tcc ttt aaa gag gca aaa ata gag gaa cat ctg gcc agg 661
 Tyr Tyr Gly Ser Phe Lys Glu Ala Lys Ile Glu Glu His Leu Ala Arg

145	150	155	
ctg gaa gct gta aca aag gaa ata gaa aca aca gga acc tac cag ctc			709
Leu Glu Ala Val Thr Lys Glu Ile Glu Thr Thr Gly Thr Tyr Gln Leu			
160	165	170	175
act ctg gat gag ctc atc ttt gcc acc aag atg gcc tgg agg aat gcc			757
Thr Leu Asp Glu Leu Ile Phe Ala Thr Lys Met Ala Trp Arg Asn Ala			
	180	185	190
cct cgc tgc atc ggc agg atc cag tgg tcc aac ctg cag gtc ttt gac			805
Pro Arg Cys Ile Gly Arg Ile Gln Trp Ser Asn Leu Gln Val Phe Asp			
	195	200	205
gct cgg aac tgt agc aca gca cag gaa atg ttt cag cac atc tgc aga			853
Ala Arg Asn Cys Ser Thr Ala Gln Glu Met Phe Gln His Ile Cys Arg			
	210	215	220
cac ata ctt tat gcc acc aac aat ggc aac atc agg tcg gcc atc act			901
His Ile Leu Tyr Ala Thr Asn Asn Gly Asn Ile Arg Ser Ala Ile Thr			
	225	230	235
gtg ttc ccc cag cgg agt gac ggc aaa cat gac ttc agg ctc tgg aat			949
Val Phe Pro Gln Arg Ser Asp Gly Lys His Asp Phe Arg Leu Trp Asn			
240	245	250	255
tca cag ctc atc cgg tac gct ggc tac cag atg ccc gat ggc acc atc			997
Ser Gln Leu Ile Arg Tyr Ala Gly Tyr Gln Met Pro Asp Gly Thr Ile			
	260	265	270
aga ggg gat gct gcc acc ttg gag ttc acc cag ttg tgc atc gac cta			1045
Arg Gly Asp Ala Ala Thr Leu Glu Phe Thr Gln Leu Cys Ile Asp Leu			
	275	280	285
ggc tgg aag ccc cgc tat ggc cgc ttt gat gtg ctg cct ctg gtc ttg			1093
Gly Trp Lys Pro Arg Tyr Gly Arg Phe Asp Val Leu Pro Leu Val Leu			
	290	295	300
caa gct gat ggt caa gat cca gag gtc ttt gaa atc cct cct gat ctt			1141
Gln Ala Asp Gly Gln Asp Pro Glu Val Phe Glu Ile Pro Pro Asp Leu			
	305	310	315
gtg ttg gag gtg acc atg gag cat ccc aag tac gag tgg ttc cag gag			1189
Val Leu Glu Val Thr Met Glu His Pro Lys Tyr Glu Trp Phe Gln Glu			
320	325	330	335
ctc ggg ttg aag tgg tat gca ctg cct gcc gtg gcc aac atg cta ctg			1237
Leu Gly Leu Lys Trp Tyr Ala Leu Pro Ala Val Ala Asn Met Leu Leu			
	340	345	350

gag gtg ggt ggc ctc gaa ttc cca gcc tgc ccc ttc aat ggt tgg tac	1285
Glu Val Gly Gly Leu Glu Phe Pro Ala Cys Pro Phe Asn Gly Trp Tyr	
355 360 365	
atg ggc acc gag att gga gtt cga gac ttc tgt gac aca cag cgc tac	1333
Met Gly Thr Glu Ile Gly Val Arg Asp Phe Cys Asp Thr Gln Arg Tyr	
370 375 380	
aac atc ctg gag gaa gtg ggc cga agg atg ggc ctg gag acc cac aca	1381
Asn Ile Leu Glu Glu Val Gly Arg Arg Met Gly Leu Glu Thr His Thr	
385 390 395	
ctg gcc tcc ctc tgg aaa gac cgg gct gtc acg gag atc aat gtg gct	1429
Leu Ala Ser Leu Trp Lys Asp Arg Ala Val Thr Glu Ile Asn Val Ala	
400 405 410 415	
gtg ctc cat agt ttc cag aag cag aat gtg acc atc atg gac cac cac	1477
Val Leu His Ser Phe Gln Lys Gln Asn Val Thr Ile Met Asp His His	
420 425 430	
aca gcc tca gag tcc ttc atg aag cac atg cag aat gag tac cgg gcc	1525
Thr Ala Ser Glu Ser Phe Met Lys His Met Gln Asn Glu Tyr Arg Ala	
435 440 445	
cgt gga ggc tgc ccg gca gac tgg att tgg ctg gtc cct cca gtg tct	1573
Arg Gly Gly Cys Pro Ala Asp Trp Ile Trp Leu Val Pro Pro Val Ser	
450 455 460	
ggg agc atc acc cct gtg ttc cac cag gag atg ttg aac tat gtc cta	1621
Gly Ser Ile Thr Pro Val Phe His Gln Glu Met Leu Asn Tyr Val Leu	
465 470 475	
tct cca ttc tac tac tac cag atc gag ccc tgg aag acc cac atc tgg	1669
Ser Pro Phe Tyr Tyr Tyr Gln Ile Glu Pro Trp Lys Thr His Ile Trp	
480 485 490 495	
cag aat gag aag ctg agg ccc agg agg aga gag atc cga ttt aga gtc	1717
Gln Asn Glu Lys Leu Arg Pro Arg Arg Arg Glu Ile Arg Phe Arg Val	
500 505 510	
ttg gtg aaa gtg gtg ttc ttt gct tcc atg cta atg cga aag gtc atg	1765
Leu Val Lys Val Val Phe Phe Ala Ser Met Leu Met Arg Lys Val Met	
515 520 525	
gct tca cgg gtc aga gcc aca gtc ctc ttt gct act gag aca ggg aag	1813
Ala Ser Arg Val Arg Ala Thr Val Leu Phe Ala Thr Glu Thr Gly Lys	
530 535 540	
tct gaa gca cta gcc agg gac ctg gcc acc ttg ttc agc tac gcc ttc	1861
Ser Glu Ala Leu Ala Arg Asp Leu Ala Thr Leu Phe Ser Tyr Ala Phe	

545	550	555	
aac acc aag gtt gtc tgc atg gac cag tat aag gca agc acc ttg gaa Asn Thr Lys Val Val Cys Met Asp Gln Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu 560 565 570 575			1909
gag gag caa cta ctg ctg gtg gtg aca agc aca ttt ggg aat gga gac Glu Glu Gln Leu Leu Leu Val Val Thr Ser Thr Phe Gly Asn Gly Asp 580 585 590			1957
tgt ccc agc aat ggg cag act ctg aag aaa tct ctg ttc atg ctt aga Cys Pro Ser Asn Gly Gln Thr Leu Lys Lys Ser Leu Phe Met Leu Arg 595 600 605			2005
gaa ctc aac cac acc ttc agg tat gct gtg ttt ggc ctt ggc tcc agc Glu Leu Asn His Thr Phe Arg Tyr Ala Val Phe Gly Leu Gly Ser Ser 610 615 620			2053
atg tac cct cag ttc tgc gcc ttt gct cat gac atc gac cag aag ctg Met Tyr Pro Gln Phe Cys Ala Phe Ala His Asp Ile Asp Gln Lys Leu 625 630 635			2101
tcc cac ctg gga gcc tct cag ctt gcc cca aca gga gaa ggg gac gaa Ser His Leu Gly Ala Ser Gln Leu Ala Pro Thr Gly Glu Gly Asp Glu 640 645 650 655			2149
ctc agt ggg cag gag gat gcc ttc cgc agc tgg gct gta caa acc ttc Leu Ser Gly Gln Glu Asp Ala Phe Arg Ser Trp Ala Val Gln Thr Phe 660 665 670			2197
cgg gca gcc tgt gag acc ttt gat gtc cga agc aaa cat cac att cag Arg Ala Ala Cys Glu Thr Phe Asp Val Arg Ser Lys His His Ile Gln 675 680 685			2245
atc ccg aaa cgc ttc act tcc aat gca aca tgg gag cca cag caa tat Ile Pro Lys Arg Phe Thr Ser Asn Ala Thr Trp Glu Pro Gln Gln Tyr 690 695 700			2293
agg ctc atc cag agc ccg gag cct tta gac ctc aac aga gcc ctc agc Arg Leu Ile Gln Ser Pro Glu Pro Leu Asp Leu Asn Arg Ala Leu Ser 705 710 715			2341
agc atc cat gca aag aac gtg ttt acc atg agg ctg aaa tcc cag cag Ser Ile His Ala Lys Asn Val Phe Thr Met Arg Leu Lys Ser Gln Gln 720 725 730 735			2389
aat ctg cag agt gaa aag tcc agc cgc acc acc ctc ctc gtt cag ctc Asn Leu Gln Ser Glu Lys Ser Ser Arg Thr Thr Leu Leu Val Gln Leu 740 745 750			2437

acc ttc gag ggc agc cga ggg ccc agc tac ctg cct ggg gaa cac ctg Thr Phe Glu Gly Ser Arg Gly Pro Ser Tyr Leu Pro Gly Glu His Leu 755 760 765	2485
ggg atc ttc cca ggc aac cag acc gcc ctg gtg cag gga atc ttg gag Gly Ile Phe Pro Gly Asn Gln Thr Ala Leu Val Gln Gly Ile Leu Glu 770 775 780	2533
cga gtt gtg gat tgt cct aca cca cac caa act gtg tgc ctg gag gtt Arg Val Val Asp Cys Pro Thr Pro His Gln Thr Val Cys Leu Glu Val 785 790 795	2581
ctg gat gag agc ggc agc tac tgg gtc aaa gac aag agg ctg ccc ccc Leu Asp Glu Ser Gly Ser Tyr Trp Val Lys Asp Lys Arg Leu Pro Pro 800 805 810 815	2629
tgc tca ctc agc caa gcc ctc acc tac ttc ctg gac att acg acc cct Cys Ser Leu Ser Gln Ala Leu Thr Tyr Phe Leu Asp Ile Thr Thr Pro 820 825 830	2677
ccc acc cag ctg cag ctc cac aag ctg gct cgc ttt gcc acg gac gag Pro Thr Gln Leu Gln Leu His Lys Leu Ala Arg Phe Ala Thr Asp Glu 835 840 845	2725
acg gat agg cag aga ttg gag gcc ttg tgt cag ccc tca gag tac aat Thr Asp Arg Gln Arg Leu Glu Ala Leu Cys Gln Pro Ser Glu Tyr Asn 850 855 860	2773
gac tgg aag ttc agc aac aac ccc acg ttc ctg gag gtg ctt gaa gag Asp Trp Lys Phe Ser Asn Asn Pro Thr Phe Leu Glu Val Leu Glu Glu 865 870 875	2821
ttc cct tcc ttg cat gtg ccc gct gcc ttc ctg ctg tcg cag ctc cct Phe Pro Ser Leu His Val Pro Ala Ala Phe Leu Leu Ser Gln Leu Pro 880 885 890 895	2869
atc ttg aag ccc cgc tac tac tcc atc agc tcc tcc cag gac cac acc Ile Leu Lys Pro Arg Tyr Tyr Ser Ile Ser Ser Ser Gln Asp His Thr 900 905 910	2917
ccc tcg gag gtt cac ctc act gtg gcc gtg gtc acc tac cgc acc cga Pro Ser Glu Val His Leu Thr Val Ala Val Val Thr Tyr Arg Thr Arg 915 920 925	2965
gat ggt cag ggt ccc ctg cac cat ggt gtc tgc agc act tgg atc agg Asp Gly Gln Gly Pro Leu His His Gly Val Cys Ser Thr Trp Ile Arg 930 935 940	3013
aac ctg aag ccc cag gac cca gtg ccc tgc ttt gtg cga agt gtc agt Asn Leu Lys Pro Gln Asp Pro Val Pro Cys Phe Val Arg Ser Val Ser	3061

945	950	955	
ggc ttc cag ctc cct gag gac ccc tcc cag cct tgc atc ctc att ggg Gly Phe Gln Leu Pro Glu Asp Pro Ser Gln Pro Cys Ile Leu Ile Gly 960 965 970 975			3109
cct ggt acg ggc att gct ccc ttc cga agt ttc tgg cag cag cgg ctc Pro Gly Thr Gly Ile Ala Pro Phe Arg Ser Phe Trp Gln Gln Arg Leu 980 985 990			3157
cat gac tcc cag cac aaa ggg ctc aaa gga ggc cgc atg agc ttg gtg His Asp Ser Gln His Lys Gly Leu Lys Gly Gly Arg Met Ser Leu Val 995 1000 1005			3205
ttt ggg tgc cgg cac ccg gag gag gac cac ctc tat cag gaa gaa Phe Gly Cys Arg His Pro Glu Glu Asp His Leu Tyr Gln Glu Glu 1010 1015 1020			3250
atg cag gag atg gtc cgc aag aga gtg ctg ttc cag gtg cac aca Met Gln Glu Met Val Arg Lys Arg Val Leu Phe Gln Val His Thr 1025 1030 1035			3295
ggc tac tcc cgg ctg ccc ggc aaa ccc aag gtc tac gtt cag gac Gly Tyr Ser Arg Leu Pro Gly Lys Pro Lys Val Tyr Val Gln Asp 1040 1045 1050			3340
atc ctg caa aag cag ctg gcc aat gag gta ctc agc gtg ctc cac Ile Leu Gln Lys Gln Leu Ala Asn Glu Val Leu Ser Val Leu His 1055 1060 1065			3385
ggg gag cag ggc cac ctc tac att tgc gga gat gtg cgc atg gct Gly Glu Gln Gly His Leu Tyr Ile Cys Gly Asp Val Arg Met Ala 1070 1075 1080			3430
cgg gat gtg gct acc aca ttg aag aag ctg gtg gcc acc aag ctg Arg Asp Val Ala Thr Thr Leu Lys Lys Leu Val Ala Thr Lys Leu 1085 1090 1095			3475
aac ttg agc gag gag cag gtg gaa gac tat ttc ttc cag ctc aag Asn Leu Ser Glu Glu Gln Val Glu Asp Tyr Phe Phe Gln Leu Lys 1100 1105 1110			3520
agc cag aaa cgt tat cat gaa gat atc ttc ggt gca gtc ttt tcc Ser Gln Lys Arg Tyr His Glu Asp Ile Phe Gly Ala Val Phe Ser 1115 1120 1125			3565
tat ggg gca aaa aag ggc agc gcc ttg gag gag ccc aaa gcc acg Tyr Gly Ala Lys Lys Gly Ser Ala Leu Glu Glu Pro Lys Ala Thr 1130 1135 1140			3610

agg ctc tga cagcccagag ttccagcttc tggcactgag taaagataat 3659
Arg Leu

ggtgaggggc ttggggagac agcgaaatgc aacccccccc aagccctca tgtcattccc 3719
ccctcctcca ccctaccaag tagtattgta ctattgtgga ctactaaatc tctctcctct 3779
cctccctccc ctctctccct ttctccctt cttctccact cccagctcc ctctttctcc 3839
ttctcctcct ttgcctctca ctcttccttg gagctgagag cagagaaaaa ctcaacctcc 3899
tgactgaagc actttgggtg accaccagga ggcaccatgc cgccgctcta atacttagct 3959
gcactatgta cagatattta tacttcatat tt 3991

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 4
cttctggcgt gtgaccggcg 20

<210> 5
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 5
atcgaattct gagatcataa tccctgtggg atgc 34

<210> 6
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 6

agggacggag aaggagt

17

<210> 7
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 7
tcacccaca gactgag

17

<210> 8
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 8
gtgggctatg ggtttgtgga aggaga

26

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

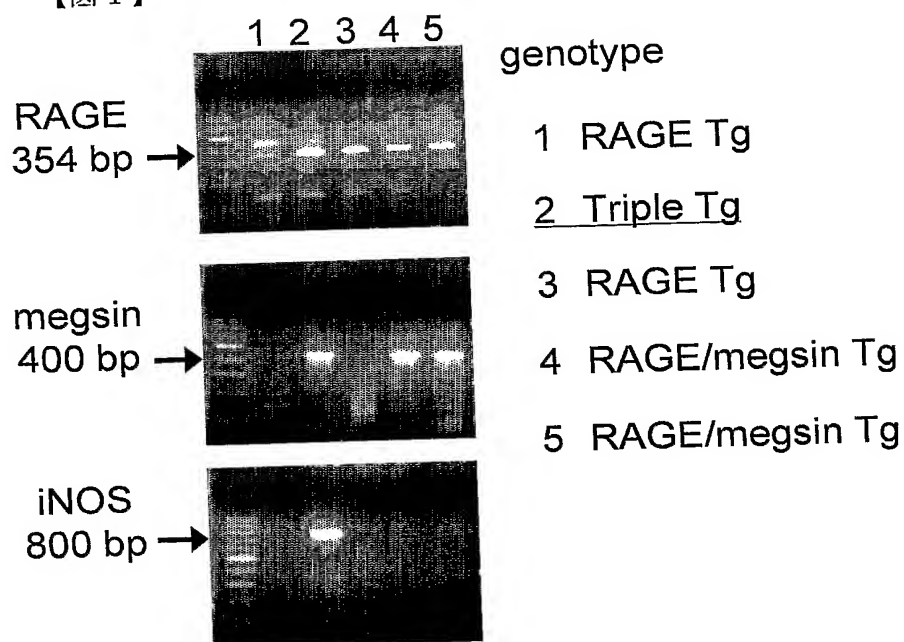
<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 9
cgatgtcaca tgcagcttgt

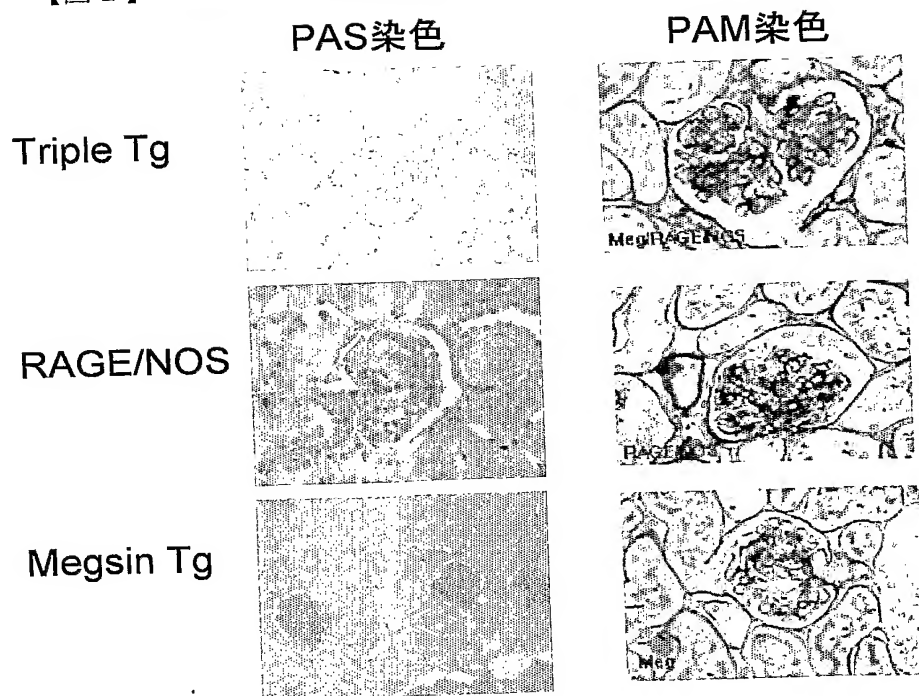
20

【書類名】 図面

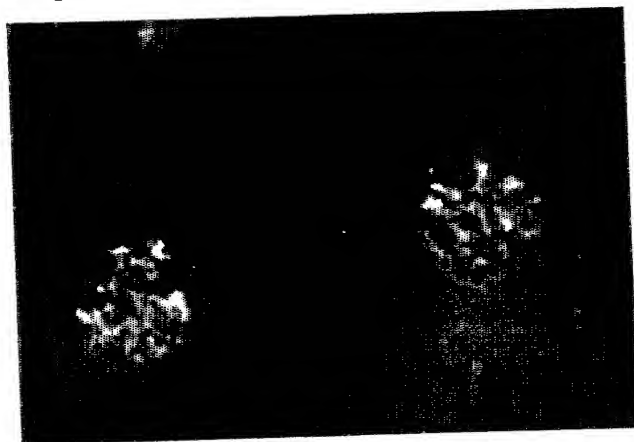
【図 1】



【図 2】



【図 3】

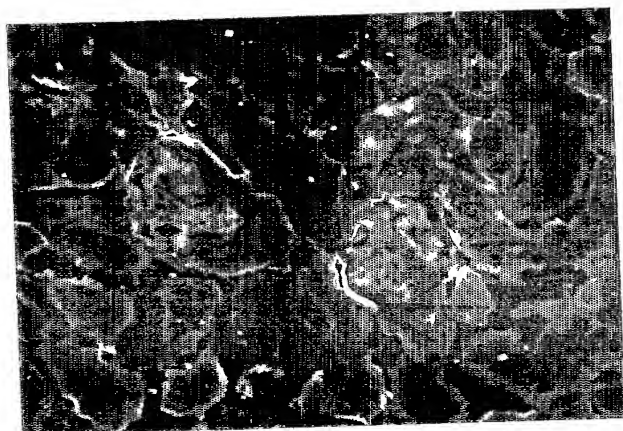


RAGE/iNOS-Tgマウス (16週齢)



Megsin/RAGE/iNOS-Tgマウス (16週齢)

【図 4】

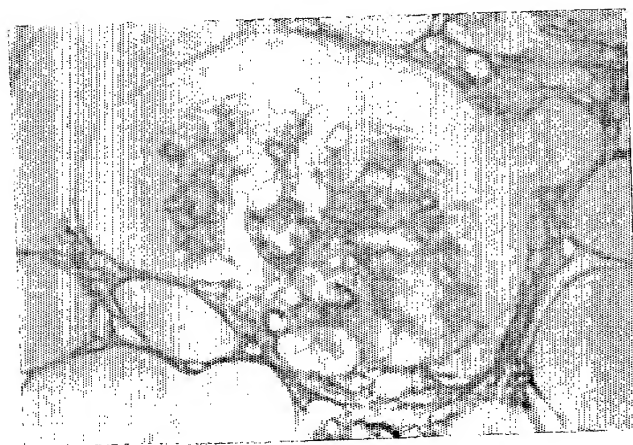


RAGE/iNOS-Tgマウス (16週齢)

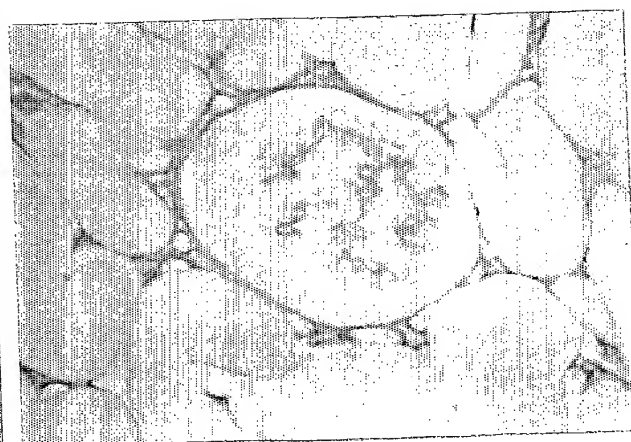


Megsin/RAGE/iNOS-Tgマウス (16週齢)

【図 5】

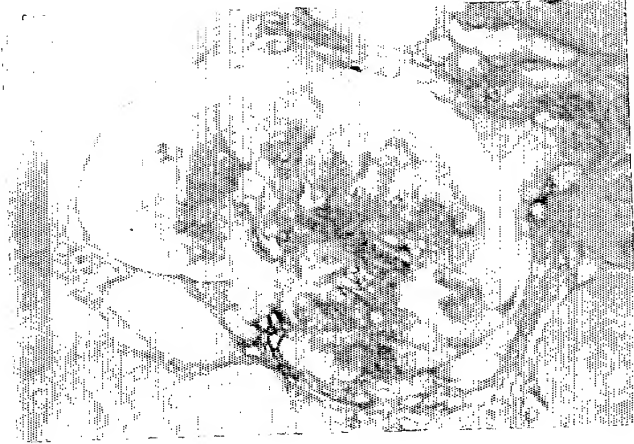


Megsin/RAGE/iNOS-Tgマウス

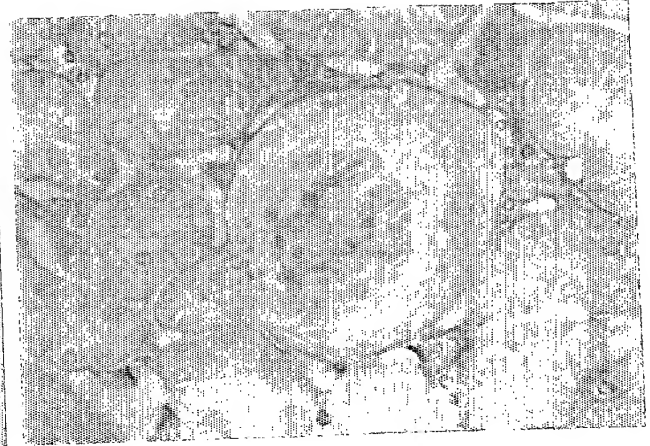


Megsin-Tgマウス

【図 6】

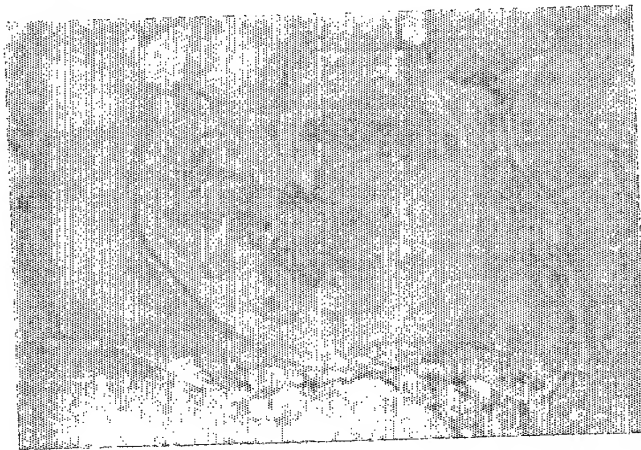


Megsin/RAGE/iNOS-Tgマウス

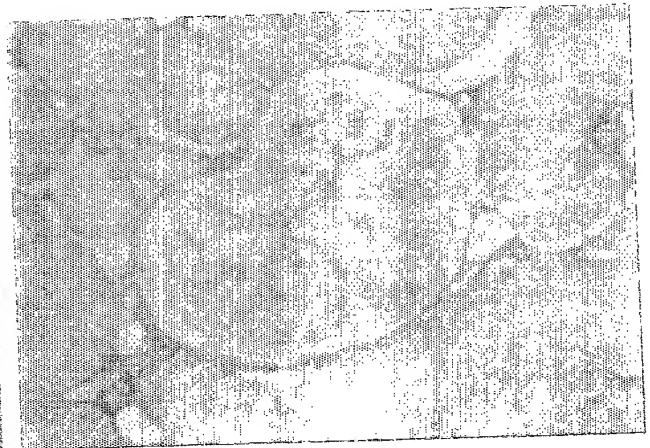


Megsin-Tgマウス

【図 7】



Megsin/RAGE/iNOS-Tgマウス



Megsin-Tgマウス

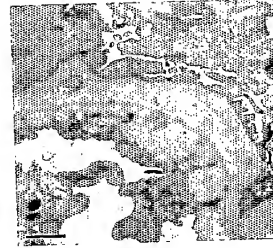
【図 8】



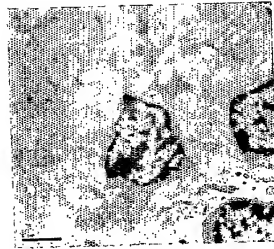
正常マウス (16週齢)
× 20,000



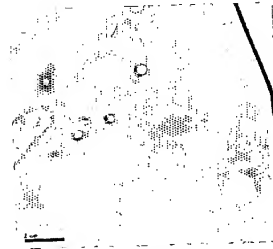
A



B



C



D

Megsin/RAGE/iNOS-Tgマウス (16週齢)
× 20,000

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 均質な腎機能障害を早期に発症し得る疾患モデル動物を提供する。

【解決手段】 メグシン-TgとRAGE/iNOS-Tgとを交配させてトリプルTg (Megsin/RAGE/iNOS-Tg) を創生した。このMegsin/RAGE/iNOS-Tgが、従来にはない著明な糖尿病性腎病変を早期に発症し、かつ糸球体肥大をはじめとする各種病理像が均一に観察されることを見出した。更にこれらの症状を示す動物が、糖尿病性腎症の疾患モデル動物として有用であることを見出した。すなわち、本発明の疾患モデル動物では、メグシン遺伝子、糖化最終産物受容体遺伝子および誘導型一酸化窒素合成酵素遺伝子を強発現しており、これにより糸球体障害を伴う腎機能障害を早期に発症する。

【書類名】 出願人名義変更届
【整理番号】 F2-A0302
【提出日】 平成16年11月24日
【あて先】 特許庁長官殿
【事件の表示】
【出願番号】 特願2003-415779
【承継人】
【識別番号】 503354217
【氏名又は名称】 株式会社ジーンセーシス
【承継人代理人】
【識別番号】 100102978
【弁理士】
【氏名又は名称】 清水 初志
【選任した代理人】
【識別番号】 100108774
【弁理士】
【氏名又は名称】 橋本 一憲
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 041092
【納付金額】 4,200円

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-415779
受付番号	50401999871
書類名	出願人名義変更届
担当官	野本 治男 2427
作成日	平成 17 年 3 月 22 日

<認定情報・付加情報>

【承継人】

【識別番号】	503354217
【住所又は居所】	愛知県名古屋市中区栄四丁目 2 番 8 号 小浅ビル 8 階

【氏名又は名称】	株式会社ジーンセーシス
----------	-------------

【承継人代理人】	申請人
----------	-----

【識別番号】	100102978
【住所又は居所】	茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階 清水国際特許事務所

【氏名又は名称】	清水 初志
----------	-------

【選任した代理人】	
-----------	--

【識別番号】	100108774
【住所又は居所】	茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階 清水国際特許事務所

【氏名又は名称】	橋本 一憲
----------	-------

特願 2003-415779

出願人履歴情報

識別番号

[503360115]

1. 変更年月日

2003年10月 1日

[変更理由]

新規登録

住所

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏名

独立行政法人 科学技術振興機構

2. 変更年月日

2004年 4月 1日

[変更理由]

名称変更

住所

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏名

独立行政法人科学技術振興機構

特願 2003-415779

出願人履歴情報

識別番号

[597142376]

1. 変更年月日

2000年10月 5日

[変更理由]

住所変更

住所

神奈川県伊勢原市桜台2丁目16-25 エクセル伊勢原10

2号

氏名

宮田 敏男

特願 2 0 0 3 - 4 1 5 7 7 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 3 3 5 4 2 1 7]

1. 変更年月日

2 0 0 3 年 9 月 2 9 日

[変更理由]

新規登録

住 所

愛知県名古屋市中区栄四丁目 2 番 8 号 小浅ビル 8 階

氏 名

株式会社ジーンセーシス